



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Contribuição ao Estudo da Iatrogênese Produzida
pela Mistura Herbicida (2,4-D + Picloram), 64/240,
Éster Triisopropanolamina em Peixes e Mamíferos.
(Estudo Morfológico)

ÉLCIO MERLIN

Tese apresentada à Universidade Federal
do Paraná para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias, Área de
Zootecnia de Produtos Aquáticos Renová-
veis.

CURITIBA
1989

Este trabalho é dedicado à
minha esposa, aos meus fi-
lhos. À minha mãe e à memó-
ria de meu pai por especi-
al significação.

AGRADECIMENTOS

Que eu consiga reconhecer nos colaboradores desta pesquisa o mesmo espírito desprendido em auxiliar-me de que fui alvo.

Meu mais profundo agradecimento ao Prof. Dr. Heitor Segundo Guilherme Medina, pela orientação dada durante o trabalho de pesquisa, pelos ensinamentos que ministrou nesta minha etapa de estudos e, o reconhecimento em me permitir estudar qualquer dia e a qualquer hora, em seu gabinete particular, durante essa tese de mestrado.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da U.F.Pr, pelos ensinamentos e sugestões emprestados durante a revisão e montagem dessa tese.

Ao Prof. Valdemiro Gremski, do Departamento de Biologia Celular da U.F.Pr, pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Orizel Curial, pelo auxílio prestado quando dos estudos histopatológicos.

Ao Dr. Eurípedes Ferreira, pela cessão do Laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas da U.F.Pr, bem como ao seu grupo de colaboradores pelas sugestões, informações e apoio, o meu agradecimento.

Ao Engº Químico Alberto Baccarim, Superintendente da SUREHMA e

Ao Dr. Urivald Pawloswski, Superintendente Adjunto, pela atenção dispensada ao trabalho que desenvolvemos e voltado inteiramente à proteção do meio ambiente.

Ao Engº Químico Charlotta Warhraftig pelo auxílio ' prestado na confecção de lâminas histológicas que forneceram microfotografias esclarecedoras de pontos importantes do trbalho.

Aos funcionários do Laboratório de Piscicultura da U.F.Pr, onde fizemos o trabalho experimental, o meu agradecimento.

Não posso deixar de agradecer, sinceramente, à Srta. Elizabeth Romanel Bittencourt, pela paciência e dedicação no trabalho de datilografia da presente tese.

Agradeço, também, às seguintes instituições colaboradoras:

À COPEL - Companhia Paranaense de Energia Elétrica, através de toda a Assessoria de Ecologia, pelos exemplares ' de peixes doados para a execução da pesquisa;

Ao Centro de Aquacultura da SUREHMA, em Toledo, pelo envio de material biológico usado nesse trabalho;

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de auxílio financeiro ' permitindo executar boa parte das pesquisas realizadas.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu mais alto reconhecimento.

Em particular quero registrar minha gratidão à NIRCE, minha esposa e aos meus filhos, DENILSON e LUCIA NA, que nas horas mais difíceis da jornada me compreenderam, estimularam e auxiliaram.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

<u>FIGURAS</u>	<u>LOCALIZAÇÃO</u>
Figuras 1, 1A e 1B.....	pp.11
Figura 1D.....	pp.12
Figuras 2 e 2.1 - 2.2	
3 - 3.1 e 3.2.....	pp.14
Figuras 4 e 4.1.....	pp.18
Figuras 5	
6 e 6.1	
7	
8, 8.1 e 8.2.....	pp.19
Figuras 9 - 10 e 10.1	
11 - 12 e 12.1	
13 e 13.1 - 14 e 14.1.....	pp.20
Figuras 15 e 15.1.....	pp.23
Figuras 16 e 16.1.....	pp.24
Figuras 17 e 17.1.....	pp.25
Figuras 18 e 18.1	
19 e 19.1	
19.2 e 19.3.....	pp.29

CONTEUDO

I. INTRODUÇÃO.....	01
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
2.1. Estudos Morfológicos.....	09
2.2. Cortes Anatômicos.....	10
2.2.1. Abertura Longitudinal.....	11
2.2.2. Corte Lateral.....	11
2.2.3. Corte Opercular.....	11
2.2.4. Corte Cranial.....	12
2.3. Estudo Macroscópico.....	12
2.3.1 Aspectos Macroscópicos.....	13
2.4. Material Biológico.....	15
2.5. Administração do herbicida aos brânquicados.....	15
res.....	15
2.6. Administração do herbicida aos peixes.....	18
III. RESULTADOS.....	19
3.1. Aspectos Bioquímicos.....	20
IV. DISCUSSÃO.....	22
V. SUMÁRIO E ABSTRACT.....	32-34
VI. CONCLUSÕES.....	36
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
VIII. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	43

I. INTRODUÇÃO

METCHNIKOFF et al (1892) observaram, no organismo animal, a existência de um grupo de células redondas e estreladas que, possuindo atividade fagocitária, atuavam através da imunidade humoral ou da mediada por células do sistema imune, contra bactérias invasoras do organismo, concorrendo para a defesa orgânica.

O referido sistema, considerado difuso, está formado por células isoladas ou reunidas na forma de retículos ou de endotélios.

Tais elementos celulares, fixos ou livres, existentes no tecido conjuntivo ou nos parênquimas apresentam a propriedade comum de fagocitar e armazenar corantes vitais e uma variedade de outros elementos, particulados ou em solução, tais como, células, antígenos, proteínas e demais substâncias estranhas, quando natural ou artificialmente forem introduzidas no organismo. Por isso, foram de início, consideradas como sistema celular por METCHNIKOFF (1892), posteriormente denominado sistema macrofágico.

O presente conceito foi mais tarde ampliado por ASCHOFF (1924) que incluiu no grupo, os endotélios especializados, entre os quais, os que revestem os sinusóides.

A medida que foram desenvolvidos métodos de marcação celular, tornou-se possível traçar as linhagens celulares e efetuar estudos citocinéticos que alteraram, de maneira substancial, os conceitos sobre esse sistema, os quais perduram até nossos dias, razão que levou alguns especialistas a congregar no sistema mononuclear fagocitário, todas as células mo-

nonucleares altamente fagocitárias, especialmente, os monócitos de sangue e os macrófagos livres e fixos dos tecidos.

Os critérios funcionais adotados para inclusão das referidas células no sistema, foram: 1.-apresentarem uma ávida fagocitose; 2.-capacidade de se ligarem firmemente ao vidro; 3.- presença de receptores superficiais de membrana para a imunoglobulina e para o complemento, os quais desempenham função importante na fase de fixação da fagocitose.

Numerosos estudos com marcadores isotópicos ou cromossômicos mostraram que, em geral, os fagócitos mononucleares originam-se a partir de células precursoras na medula óssea, de onde são transportados pelo sangue periférico, como monócitos e, de lá, para os tecidos, onde se transformam em macrófagos. Por isso, os fagócitos mononucleares não aparecem nos tecidos ou nos órgãos embrionários antes que esses se tenham tornado vascularizados.

Em sentido mais amplo, o referido sistema se caracteriza pelo exercício da fagocitose e da atrofocitose, enquanto que o sistema imunitário, se constitui basicamente, por três tipos diferentes de células, a saber, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, dos quais, os linfócitos representam os efetores da resposta imune, ao passo que os macrófagos são assessores daquele processo.

A partir dos estudos de METCHNIKOFF (1892, 1901 e 1905); MESNIL (1895), NOGUCHI (1903) e seus contemporâneos, se reconhece que os peixes são capazes de produzir uma resposta imune frente a materiais estranhos, porém, somente na década passada, o processo envolvido na resposta foi objeto de intensos estudos.

Como resultado e, em base nos estudos filogenéticos realizados nos vertebrados, (GOOD & PAPERMASTER, 1964; SMITH et al, 1966), considerável esforço foi dispendido para reconhecer os mecanismos dos processos que regulam a imunidade nos peixes.

Muitos dos trabalhos iniciais resultaram de esforços empíricos procurando produzir imunidade contra doenças infecciosas, porém, sem elucidar os processos básicos que se acham envolvidos, (KLONTZ & ANDERSON, 1970; SNIESZKO, 1970).

Em virtude disso, todas as atenções se dirigiram recentemente, para a aplicação dos novos conhecimentos básicos para compreender os mecanismos envolvidos na proteção dos peixes contra as infecções microbianas. Com as informações agora conseguidas, será possível retomar muitos dos trabalhos sobre a imunização artificial dos peixes e, em especial, contra os agentes infecciosos específicos.

As primeiras espécies de peixes a apresentarem uma atividade imunológica incluindo ambas as respostas, celular e humoral, encontram-se descritas entre os Agnata, dos quais o "hagfish", um peixe ciclóstomo parecido com a enguia marinha, e a lampréia são capazes de rejeitar enxertos e de responder com produção de anticorpos quando estimulados com antígenos particulados ou solúveis.

Por outro lado, aparecem nos teleosteos duas classes diferentes de anticorpos, IgG e IgM, sendo que as imunoglobulinas foram isoladas dos pronefros dos peixes teleosteos. Característica interessante e exclusiva da imunidade dos vertebrados, é o efeito que a temperatura exerce na função imunitária e que se repete em algumas espécies de peixes. Tal

assertiva se confirma com o aparecimento de anticorpos em animais de sangue frio, fato que somente ocorre acima de determinada temperatura ambiental e, ainda, nos próprios peixes, a fagocitose, considerada como um dos principais fenômenos que ocorrem nos processos inflamatórios, aparece quando se eleva a temperatura dos aquários.

Células análogas aos granulócitos, macrófagos e linfócitos dos mamíferos têm sido identificadas em todos os grupos de peixes. incluindo-se as espécies mais primitivas de ciclóstomos, o *Eptatretus stoutii* do Pacífico (LOCKINGTON, 1878; HILDEMANN & THOENES, 1969). Embora não se tenha detectado imuno respostas no "hagfish", (PAPERMASTER et al, 1962, 1964), trabalhos subsequentes, (HILDEMANN & THOENES, 1969; LINTHICUM & HILDEMANN, 1970; ACTON et al, 1971) verificaram que o "hagfish" pode manifestar imunidade mediada por células e por anticorpos sob condições adequadas, fato que indica que esses animais possuem equivalentes funcionais aos linfócitos e plasmócitos dos mamíferos. Além disso, a variedade de células identificadas como macrófagos, linfócitos e granulócitos foi observada nos tecidos do "hagfish" nos sítios de reações imunes.

É fato conhecido que os antígenos, especialmente os particulados, uma vez introduzidos no organismo são captados pelos macrófagos. Entretanto, não foi possível demonstrar, de modo direto, a participação dessas células no fornecimento da informação antigênica aos linfócitos. Muitos fatos parecem indicar ser essa etapa necessária para que possa ocorrer a elaboração da resposta imunitária. Nessa situação, a produção de anticorpos somente se faz-se durante a fase de indu-

ção existirem macrófagos. Por outro lado, os linfócitos T tornam-se mais facilmente estimulados a proliferar, *in vitro*, se o antígeno lhes for apresentado juntamente com os macrófagos. Assim, o poder imunogênico do antígeno aumenta muito, se for previamente englobado pelos macrófagos, (BOGLIOLLO, 1978).

Muitas hipóteses foram aventadas para justificar a participação dos macrófagos na resposta imunitária. Bem verdade, haptenos podem funcionar como determinantes antigênicos quando associados a um transportador, em geral, uma proteína, consubstanciando seu efeito transportador. De fato, várias experiências demonstram que os linfócitos B reconhecem o hapteno, enquanto que os linfócitos T reconhecem a proteína transportadora. O reconhecimento do hapteno se visualiza ao se manifestar a reação imediata - imunidade humoral - enquanto que a reação retardada - imunidade celular - implica no reconhecimento da proteína transportadora.

Os receptores dos linfócitos B, são imunoglobulínicos, sobretudo IgM monômera; mas pode haver, também, Ig de outras classes. A natureza dos receptores dos linfócitos T, é desconhecida. Alguns autores dizem haver número limitado de Ig. Ao que parece, os receptores dos linfócitos T, não Ig, são moléculas diferentes. Por isso, o sistema de reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T deve ser duplo. É sobre esse duplo sistema que se baseiam todas as hipóteses de cooperação entre macrófagos e linfócitos.

Nem sempre é possível constatar na natureza situações em que organismos vivos são sujeitos à ação de substâncias químicas estranhas ao meio ambiente e que foram artificialmente adicionadas ao solo e às águas, causando sérias conse-

quências aos componentes da biocenose.

Entretanto, dois grandes impactos ambientais ocasionados, ambos, pelo uso de fenoxiacetatos foram amplamente estudados neste Laboratório; o primeiro deles, ocorrido no Mato Grosso do Sul, (MEDINA et al, 1986) contaminou o rio Miranda; foi ocasionado pelo uso do "Agente Laranja", comercializado pela BASF sob a denominação de (U-46), levando à mortandade de mais de um milhão e duzentos mil peixes e, ao mesmo tempo, afetando pelo menos, trinta quilômetros rio abaixo e, ainda, larga extensão do rio Vermelho, Abobral, Pantanal, pondo em risco o já frágil ecossistema da região, (MEDINA & BISCAIA de MEDEIROS, 1986).

O segundo, teve características diferentes quanto ao micronicho atingido, por ter ocorrido na baía de Guaraqueçaba (PR), atingindo o ambiente marinho e também os rios de água salobra, levando à morte milhares de peixes. O agente tóxico utilizado foi o TORDON (2,4-D mais picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina, produzido e comercializado pela DOW QUÍMICA Co. e, desta vez empregado no preparo das pastagens para criação de búfalos, (MEDINA et al, 1988).

A experiência adquirida nos monitoramentos levados a efeitos no rio Miranda (MS) e na baía de Guaraqueçaba (PR) por ocasião dos impactos ambientais tóxicos mencionados, demonstrou haver estreita semelhança entre as lesões macro e microscópicas, na pele e nos órgãos internos (mesonefro e fígado), apresentadas pelos peixes vitimados em ambas as regiões, com aquelas observadas por LANDSTEINER (1947), quando descreveu os sinais e os sintomas da reação de hipersensibilidade específica, adquirida e mediada por células.

Com base nesses achados resolveu-se tentar, numa primeira fase, a reprodução experimental da mesma fenomenologia, em peixes teleosteos (Prochilodus scrofa, S), corimbatãs, criados em cativeiro e ao abrigo da ação tóxica de qualquer biocida, aos quais se administrou, via oral, doses diárias da solução aquosa a 1:1000, (0.912 microg/ml) do herbicida TORDON (2,4-D mais picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina, durante 90 dias e, numa segunda etapa, observar a repercussão produzida pelo processo reacional desencadeado algum tempo mais tarde por nova administração, via oral, do herbicida sobre o comportamento do Sistema Retículo Endotelial e sobre o Sistema Imunitário dos referidos animais.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e os métodos empregados no presente trabalho seguiram duas linhas de investigações: 1. A primeira, descritiva, está calcada no estudo dos achados morfológicos encontrados nos peixes, nas aves e nos mamíferos, naturalmente intoxicados, durante os impactos ambientais químicos; 2. A segunda, experimental, está baseada na análise e na comparação das lesões morfológicas e funcionais apresentadas pelos integrantes da biocenose agredida, com as que são produzidas quando, nas mesmas condições experimentais, bioindicadores da mesma espécie ou de espécies diferentes são submetidos aos efeitos das substâncias que se supõem causadoras da ação agressora; no presente caso, os clorofenoxiacetatos.

Os efeitos produzidos nos vertebrados pela mistura herbicida TORDON (2,4-D mais picloram), 64/240 éster triisopropanolamina, foram escolhidos para avaliar se os sinais e sintomas apresentados pelos peixes do rio Miranda (MS) e pelos da baía de Guaraqueçaba (PR), observados durante a vigência dos respectivos impactos ambientais, se assemelhavam em termos de aspecto, natureza e intensidade, aos produzidos experimentalmente, pelo referido herbicida.

Os métodos de estudo postos em prática procuram equacionar o problema do diagnóstico qualitativo do agente agressor, em termos de lesão molecular, e de acordo com os seguintes parâmetros: Bioindicador + Agressor químico = lesão molecular + Sinais e Sintomas.

Desse modo, foi procedida a análise e a interpretação da sintomatologia morfológica e funcional, precoce ou tardia,

gravada pelo agressor nos peixes do rio Miranda (MS) e nos de Guaraqueçaba (PR) e, a seguir, comparados com os que foram obtidos na experimentação, usando para isso, corimbatãs criados em cativeiro e vertebrados de espécies diferentes.

A múltipla escolha de bioindicadores testemunhos de espécie, grau de evolução e padrões genéticos diferentes, teve por finalidade surpreender na origem e na simplicidade do quadro reacional, a natureza da lesão molecular e, eventualmente, as lesões morfológicas que foram provocadas pela atividade agressora do biocida.

Procura-se, desse modo, confirmar ou infirmar se, determinada lesão, que se acredita patognomônica, apareceu nos demais membros do grupo de bioindicadores testemunhos ou, pelo menos, em mais de um deles, quando tratados nas mesmas condições experimentais.

2.1 Estudos Morfológicos

Os estudos morfológicos foram realizados nos peixes moribundos ou nos que foram sacrificados durante os acidentes ambientais ocorridos, respectivamente, no rio Miranda (MS) e na baía de Guaraqueçaba (PR), e procedidos mediante o emprego de métodos e técnicas morfológicos utilizados em histopatologia de vertebrados.

Durante os trabalhos, foram observados todos os preceitos técnicos para manter os tecidos dos peixes, nas melhores condições de conservação e, desse modo, obter preparações histopatológicas satisfatórias. Os tecidos dos peixes estão mais facilmente sujeitos aos processos da autólise, os homeotermos oferecendo maior resistência ao fenômeno.

Dos materiais recebidos para exame morfológico, somente os dos peixes capturados vivos ou moribundos foram encaminhados e preparados para os estudos especializados. Os demais foram destinados para os exames complementares.

Os tegumentos e tecidos dos teleosteos são altamente suscetíveis às ações traumáticas externas. Por isso, os resultados da inspeção macroscópica foram considerados válidos somente quando procedidos logo após a captura e sacrifício dos referidos peixes mediante a secção transversal do sistema nervoso central.

Cuidados especiais cercaram a retirada do material para os exames histopatológicos, afim de evitar que as lesões de etiologia patológica não fossem confundidas com as que são produzidas por outras causas.

Terminada a inspeção macroscópica, os resultados foram descritos e cuidadosamente avaliados.

Os peixes não trabalhados foram conservados segundo as indicações de STORER & USINGER (1985) que recomenda dividir o corpo animal em três (3) partes, no sentido transversal, para facilitar a penetração dos líquidos fixadores e preservar as estruturas dos órgãos internos. O método permitiu rever e confirmar em diversas oportunidades, resultados anteriormente formulados.

2.2 Cortes Anatômicos

As necrôpsias realizadas para fins de estudo morfológico, em peixes provenientes das localidades dos impactos ambientais ou mesmo oriundos da experimentação, foram realizadas após o sacrifício de cada um dos exemplares no dia esti-

pulado para o término da intoxicação, ou próximo daquela data, a não ser que se apresentassem moribundos.

A abertura do corpo animal e os exames macroscópicos das vísceras e demais órgãos foram facilitados, mediante um esquema de cortes anatômicos. (Figura 1)

2.2.1. Abertura Longitudinal

A técnica é utilizada para observação e retirada dos órgãos, especialmente fígado e os mesonefros. O corte tem início ao se introduzir na papila urogenital a ponta de um dos ramos de uma tesoura romba e, em estreito contato com a parede ventral da cavidade celômica, de modo a não causar qualquer dano aos órgãos internos subjacentes. Dessa forma, o corte prossegue em linha reta, em direção a cabeça do animal, passando entre as nadadeiras peitorais e as guelras, em direção ao mento. (Figura 1A)

2.2.2 Corte lateral

O peixe colocado em decúbito lateral, permite o início do corte, que partindo da papila urogenital, descreve um arco que passa pela superfície lateral do corpo do animal e por cima do bordo do opérculo e penetra na cavidade branquial. Quase sempre o mesonefro do lado aberto fica aderido à parede lateral extirpada e, dessa forma, poderá ser dissecado rapidamente e sem esforço. (Figura 1B)

2.2.3 Corte opercular

Pratica-se o corte opercular para que as brânquias possam ser retiradas sem dificuldade, desde que se levante o o-

pêrculo branquial com uma pinça. (Figura 1C)

2.2.4. Corte cranial

O presente corte visa a retirada do cérebro. É feito na direção antero-posterior, mantendo-se fixa a cabeça do animal por intermédio de uma pinça curva e resistente, o que facilita a coleta do material. (Figura 1D)

2.3 Estudo macroscópico

Vísceras e bexiga natatória foram cuidadosamente retiradas e examinadas nos seus aspectos macroscópicos e, em seguida, cada órgão foi dividido em pequenas peças medindo 1cm² de superfície por 0.5 cm de espessura e deixados permanecer em recipientes adequados, sobre leito de algodão e ao contato de uma camada líquida do fixador cujo volume correspondeu a 20 vezes o da peça a fixar.

Entre as misturas fixadoras, foi dada preferência à solução tamponada de formol a 20% ou então ao formol ácido contendo 5% de ácido fórmico como agente descalcificador.

Quando foi necessário operar a macrofixação de determinado exemplar anatômico, afim de manter detalhes ou os aspectos naturais das lesões, foram utilizadas as soluções de Kaiserling ou a de Jores que se mostraram altamente satisfatórias.

As misturas fixadoras pícricas, Bouin-Hollande bem como o Bouin simples, mostraram-se particularmente endurecedoras dos tegumentos dos peixes, razão pela qual, o fenol em solução a 8% em álcool metílico absoluto segundo LENDRUM, passou

a participar das soluções fixadoras e dos processos de inclu
são em parafina (ROBERTS, 1978). Os tecidos fixados na solu-
ção de CARNOY sofreram retrações que foram evitadas ou corri-
gidas quando a fixação foi procedida a baixa temperatura, du-
rante 1 ou 2 horas.

As peças fixadas em formol ácido ou tamponado, foram lavadas durante algumas horas em água corrente ou então em á
gua amoniacal. A seguir, os cubos de tecidos foram desidrata-
dos na série ascendente dos alcôois, inclusive em dois banhos de álcool metílico contendo 8% de fenol, dando-se continuidade
de aos processos normais da inclusão em parafina.

O clorofórmio foi, neste caso, o solvente intermedi
ário entre os alcôois e as parafinas. O material fixado em CARNOY permaneceu 3 horas na solução metílica fenicada de LENDRUN, antes dos banhos de parafina, dissolvida em cloro-
fórmio.

Para os estudos panorâmicos, foram utilizadas colo-
rações pelas hematoxilinas de Harris e Delafield, contrasta-
das pela eosina azul. A fucsina de Ziehl destacou a substân-
cia ceróide depositada em torno dos vasos sanguíneos e dos
canais biliares dos espaços Porta. A deposição de hemosideri-
na foi posta em relevo pelo método do azul da Prússia contras
tada pela hematoxilina-eosina.

2.3.1. Aspectos macroscópicos.

Algumas espécies de peixes, por exemplo a dos bagres
amarelos ou os pererês encontrados na baía de Guaraqueçaba,
permanecem, percorrem e se alimentam junto ao fundo das águas
e, mesmo os corimbatãs, provenientes do rio Miranda ou os cria

dos e mantidos em cativeiro, apresentaram quando intoxicados, tegumentos avermelhados e com aspectos semelhantes aos que se apresentam nas infiltrações hemoglobínicas ou nas lesões eritematosas. O exame minucioso do revestimento cutâneo dos bagres revelou tratar-se de uma intensa hiperemia capilar superficial, fato que lhes empresta aspecto característico avermelhado róseo (Figura 2 e 2.1). Nos peixes de escamas como os corimbatãs, as referidas lesões se assemelharam a petéquias situadas sob as escamas. Afora as referidas lesões, os demais aspectos externos nada mais apresentaram que pudessem ser atribuídos aos efeitos dos fenoxiacetatos.

Todos esses aspectos externos contrastam com a consistência amolecida e a coloração amarelo-avermelhada do fígado e com a coloração escura dos emunctórios mesonéfricos. Tais aspectos chamam, desde logo, a atenção do observador. (Figura 2.2)

As guelras, de modo geral, nada apresentaram de anormal que pudesse ser atribuído a causa tóxica, mesmo em um dos animais que apresentou a mucosa estomacal avermelhada semelhante às encontradas nos processos cáustico-inflamatórios. (Figura 3)

Os peixes, especialmente os corimbatãs, que procederam do rio Miranda (MS), em 1985 bem como os que foram capturados vivos nos mesmos locais, em agosto de 1986, portanto, fora da época da mortandade aguda ali ocorrida, apresentaram, quando abertos e eviscerados, sufusões sanguíneas que circundavam os mesonefros (Figura 3.1 e 3.2) sintoma não observado entre os bagres capturados nas diversas localidades examinadas provavelmente, em função de fatores ligados à espécie. Em compensa

ção, as lesões eritematosas, abundante nos bagres, foram pouco frequentes nos corimbatãs coletados no Mato Grosso do Sul.

2.4. Material biológico.

a- Ratos brancos, (Rattus norvaegicus,B); b- Carneiros (Ovis ovis,L) da raça Ideal; c- Aves (Gallus gallus,L) da raça Leghorn, todos de procedência autorizada, e d- Peixes (Teleosteos), corimbatãs (Prochilodus scrofa,S); originários do reservatório de Capivari-Cachoeira, cedidos por gentileza do Dr. Luiz Carlos Freitas, foram submetidos aos efeitos da intoxicação produzida pelo herbicida TORDON (2,4-D + Picloram) éster Triisopropanolamina; adquirido de fonte comercial.

2.5. Administração do herbicida aos bioindicadores.

O herbicida foi administrado aos bioindicadores, pela via oral, em solução aquosa em água destilada e na concentração de 1 mg por litro, (p/v), durante 90 dias, tempo necessário para que as lesões histopatológicas produzidas nos emunctórios hepato-renais dos animais intoxicados pudessem ser comparadas com aquelas que foram observadas em corimbatãs do rio Miranda, nos bagres amarelos (Cathurus spixii) e nos bagres pererês (Genidens genidens)- capturados na baía de Guaraqueçaba, por ocasião do impacto ambiental químico, ocorrido em 1988, naquela parte do litoral paranaense, contaminado em consequência do uso inadequado do referido herbicida.

A ingestão oral foi a via escolhida para administrar a solução herbicida aos animais de experimentação, uma vez que a mesma representa a via principal de intoxicação para

os vertebrados, peixes, aves e mamíferos e, possivelmente, para os trabalhadores rurais que venham a ingerir água poluída pelo herbicida. O processo contou, inicialmente, com o auxílio de uma sonda gástrica, utilizada nos peixes e eventualmente, nos ratos.

A seguir, com excessão dos peixes, todos os bioindicadores passaram a ingerir, normalmente, a água contendo o herbicida, aceitando-a sem maiores problemas, porque os referidos heterormônios não emprestam à água qualquer modificação de aroma ou paladar, não sendo por isso, rejeitada pelos animais, mesmo quando soluções concentradas do herbicida foram empregadas.

Os animais em experimentação foram mantidos no laboratório onde receberam tratamento adequado, cuidados e tratamento alimentar, de acordo com os hábitos de cada um.

A alimentação constou de rações balanceadas, de boa procedência, adquiridas no comércio e indicadas para as diferentes espécies de animais de experimentação.

Os peixes reservados para intoxicação experimental, foram mantidos em aquários de 250 litros contendo água filtrada em carvão ativado, para evitar a presença de substâncias tóxicas, outras, que pudessem mascarar os resultados experimentais.

Os efeitos produzidos pela absorção do herbicida através das guelras não foram estudados em virtude de não se ter comprovado nelas, a presença de lesões específicas de natureza química; a não ser as produzidas em consequência da presença de parasitos, normalmente encontrados nos peixes procedentes de sítios selvagens.

A mistura herbicida (2,4-D + Picloram), resulta da mistura de dois fitormônios análogos do fitormônio natural, o ácido indol-3-acético (IAA), substâncias dotadas de alta nocividade.

Inicialmente, os peixes, os ratos e os carneiros ingeriram a solução de herbicida administrada com o auxílio de uma sonda gástrica e, a seguir o fizeram normalmente aceitando a solução herbicida sem maiores problemas, porque a referida substância não empresta à água, qualquer modificação de aroma ou paladar, não sendo por isso, rejeitada, por qualquer dos animais em estudo, masmo quando se empregaram soluções concentradas da mistura do herbicida.

No início da experimentação e afim de não produzir nos diferentes bioindicadores, qualquer tipo de modificação, consequente ao manuseio, foram os animais previamente condicionados a ingerirem a solução herbicida sob os efeitos do "Thirsty-drive". Para isso, os ratos foram deixados em jejum de água, durante 48 horas e, a seguir, transferidos para uma gaiola de "Skinner", ocasião que chegaram a ingerir soluções aquosas concentradas do herbicida (5 ml da solução comercial pura de TORDON) por litro, sem que, por isso refugassem a substância.

Em quaisquer circunstâncias, foram tomadas todas as precauções para que os animais nada sofressem, se aclimassem às condições do laboratório e do biotério, ao mesmo tempo, se condicionassem ao binômio tratador/alimento.

A via celomática, bem como a própria gastrointestinal foram utilizadas como comprobatórias dos efeitos diretos ou colaterais do herbicida ou que pudessem ter acontecido ex

pontaneamente no meio ambiente contaminado, agindo de maneira subletal, crônica e progressiva ou então, durante o tempo que durou o período da intoxicação experimental e, desse modo, conhecer as etapas que se sucedem a medida que a droga se elimina e se acumula nos emunctórios hepato-renais.

Durante o espaço de tempo necessário para se produzirem os efeitos e as consequências da intoxicação, todos os animais foram observados diariamente afim de surpreender qualquer sinal ou sintoma decorrente da intoxicação química. Paralelamente, os ratos receberam, via oral, soluções contendo ácido indol-3-acético (IAA) e o ácido naftalene acético (NAA), na mesma concentração indicada para o herbicida, dois fitormônios satélites do 2,4-D e do Picloram, afim de verificar se o grupo dos referidos fitormônios poderiam produzir paralelamente modificações morfológicas e funcionais idênticas as obtidas na intoxicação pela mistura (2,4-D + Picloram). (Figura 4 e 4.1)

2.6. Administração do herbicida aos peixes.

Os peixes ao serem retirados dos aquários foram mantidos em decúbido dorsal sobre a mão do operador, protegida por um pano escuro, bem molhado, para cobrir a cabeça do animal afim de evitar o estímulo luminoso, artifício esse que o mantém imóvel fora da água, permitindo tempo suficiente para as manobras necessárias que precedem a entubação gástrica. Uma vez introduzida a sonda na profundidade conveniente, injeta-se herbicida contido na seringa.

III. RESULTADOS

Os exames histopatológicos procedidos em peixes, aves e mamíferos intoxicados com a mistura herbicida (2,4-D + Picloram), demonstram plenamente, que as lesões hepato-renais produzidas pela droga em estudo, se identificam com as descritas por LANDSTEINER (1947), na reação de hipersensibilidade de específica mediada por células.

As lesões produzidas pelos fenoxiacetatos são mais constantes nos emunctórios hepato-renais e demonstram que o processo, inicialmente agudo e exsudativo, linfoplasmocitário, (Figura 5), agride os espaços Porta, produz esclerose vascular e dos canalículos biliares que aumentam em número. Os hepatócitos perdem a disposição trabecular e o tecido, as características normais do parênquima hepático. (Figura 6 e 6.1) As lesões crônicas passam a ser representadas pelas fibroses que acometem os vasos e os canalículos portais. (Figura 7)

Macrófagos e hepatócitos, contendo pigmento de hemossiderina (Figura 8, 8.1 e 8.2) se difundem pelo parênquima hepático, onde também, se observam lesões e necrose focal, fibrose da adventícia da veia centro lobular, transformação gordurosa, hiperplasia de células endoteliais, infiltração dos tecidos fibrosados e deposição de pigmento céreo nos hepatócitos e nos espaços Porta.

Necrose, fibrose da adventícia de um vaso com hiperplasia endotelial, transformação gordurosa, picnose dos hepatócitos, infiltração dos tecidos fibrosados, pigmento castanho nos hepatócitos e nos espaços de Disse dilatado com his-

tiócitos contendo pigmento castanho que completam o quadro histopatológico. (Figura 9).

As lesões renais foram as mais significativas estavam presentes necrose do epitélio tubular e grandes infiltrações linfocitárias intersticiais. Um segundo achado constante foi o aumento da celularidade dos glomérulos (Figura 10 e 10.1), eversão do epitélio tubular para dentro da cápsula de Bowman (Figura 11), degeneração hialina do epitélio tubular (Figura 12 e 12.1), necrose do epitélio dos túbulos proximais e distais, diminuição e atrofia dos glomérulos de Malpighi (Figura 13 e 13.1). Neste ponto, a lesão observada nas aves (Gallus gallus) foi muito mais grave do que as produzidas nos peixes. Os túbulos contornados proximais e distais continham por vezes, substância proteica no interior (Figura 14 e 14.1) ou, então, espessamento da membrana, rodeada de elementos inflamatórios provenientes da inflamação subaguda focal e intersticial. O aumento da permeabilidade das paredes dos capilares justifica a presença de macrófagos e a infiltração de mono e polimorfonucleares nos tecidos.

3.1.Aspectos bioquímicos.

Estudos em microscopia eletrônica demonstraram que o revestimento epitelial dos túbulos uriníferos sofre, na realidade, dissociação das células epiteliais a qual tem início junto a membrana basal, propagando-se em direção a luz tubular, embora permaneçam, ainda, unidas pelos desmosomos e pelos aparelhos conjuncionais. Os referidos aspectos histopatológicos do parênquima renal foram observados a partir do 50 dia da administração do herbicida, feita aos ratos pela

via oral.

Exames procedidos nas urinas dos ratos assim tratados revelaram ter se processado importante aumento de albuminúria (MANGILI et al, 1989), a qual coincidiu com o aparecimento das lesões morfológicas dissociativas das células do parênquima renal. Resultados preliminares com os rins destes mesmos animais, processados para microscopia eletrônica, utilizando o vermelho de rutênio como corante catiônico (GREMSKI' et al, 1988), sugerem diminuição da densidade dos sítios aniônicos na membrana glomerular, indicando alteração no conteúdo de proteoglicanas, o que poderia justificar a proteinúria neste modelo experimental.

Os quadros histopatológicos dos mesonefros se faziam acompanhar de um intenso descolamento e dissociação das células epiteliais dos túbulos uriníferos dando margem a que as células epiteliais dissociadas ou aglomeradas levassem a formação de cilindros epiteliais e ocupassem a luz do que teria sido o antigo túbulo contornado renal. (Figura 14)

A consistência das lesões histopatológicas descritas nos mesonefros dos peixes e nos rins dos mamíferos, bem como no parênquima hepático dos bioindicadores, demonstra que os referidos emunctórios foram atingidos pelos efeitos colaterais nocivos dos fenoxiacetatos.

IV. DISCUSSÃO

O conceito de inocuidade que se atribui aos herbicidas auxínicos, fez com que tais biocidas fossem, desde logo, aceitos e, sem maiores cuidados, largamente utilizados na lavoura e com essa finalidade, empregados na capina química das ervas daninhas.

Diante dos resultados fornecidos pela pesquisa, não restou a menor dúvida de que os herbicidas do grupo dos clorofenoxiacetatos, com excessão do ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético que contém dioxina, e por isso tóxico. Os demais fitormônios do grupo não são tóxicos, isto é, não agredem quimicamente e no sentido toxicológico, a matéria viva, porém, são, por outro lado, altamente nocivos. (Figura 4 e 4.1)

A esse respeito, a toxicidade e a nocividade são duas propriedades dos venenos, por sinal, completamente diferentes. A primeira mata diretamente o citoplasma em curto espaço de tempo, produzindo nele, e ao nível molecular, uma lesão bioquímica (PETERS, 1952), incompatível com os fenômenos vitais, ao passo que a nocividade, agindo acima da esfera molecular, poderá causar a morte, a médio ou a longo prazos, na dependência da gravidade dos efeitos ou das lesões diretas ou colaterais produzidas. Tal eventualidade teve lugar em ambos impactos ambientais já referidos e confirmados experimentalmente.

De qualquer maneira, o diagnóstico da intoxicação se fundamentou no aspecto e na etiopatogenia das lesões apresentadas pelos órgãos e pelos tecidos dos animais examinados

e, bem assim, nos resultados fornecidos pelos vertebrados experimentais, peixes, aves e mamíferos, tratados com a mistura herbicida TORDON (2,4-D + Picloram), 64/240, éster Triiso propanolamina.

Durante os resultados e as pesquisas sobre a intoxicação experimental dos referidos vertebrados, produzida pela mistura herbicida, dois aspectos diferentes de alterações chamaram atenção. O primeiro acompanhou, de perto, as etapas e as modificações histopatológicas descritas por LANDSTEINER (1947), quando descreveu a reação imunitária retardada de sensibilidade mediada por células que acontece quando substâncias químicas simples e não imunogênicas, introduzidas no organismo, formam um conjugado com proteínas e adquirem a capacidade para sensibilizar a pele e os tecidos. (Figura 15 e 15.1)

A reação aparece após certo período de tempo e depois que ocorre um segundo contato com a substância estranha e se manifesta por fenômenos consequentes a uma hipersensibilidade adquirida que se caracteriza por uma série de alterações básicas.

Conforme a gravidade da sensibilização e da espécie animal, tem lugar o aparecimento de dilatação capilar, eritemas, petéquias, sufusões sanguíneas, exsudação, edemas, formação de crostas, especialmente nos mamíferos, inclusive no homem, onde foi observado fenômeno de liquenificação, (MEDINA et al, dados não publicados). (Figura 15 e 15.1) Entre os peixes predominaram as petéquias sob as escamas ou, então, lesões eritematosas, como as observadas nos bagres de Guaraqueçaba, Antonina e Morretes e, ainda, sufusões sanguíneas perimesonêfricas que atingem, preferencialmente, os corimbatãs. (Figura 2 e 2.1)

Os emunctórios hepato-renais foram, entre os peixes e entre as aves, os que mais sofreram. Foi comum a coloração amarelo-avermelhada do fígado e a castanho-avermelhada dos mesonefros. (Figura 2.2 e 2.3) Eram comuns as necroses hepáticas e renais, degenerações e infiltrações plasmocitárias e histiocitárias, porém as lesões que mais se destacaram pertencem aos quadros da glomerulonefrite proliferativa de hipersensibilidade específica tipo LANDSTEINER (1947). (Fig. 16/16.1)

Lesões dos capilares do tufo glomerular, necrose e atrofia dos glomérulos predominaram nas aves, ao passo que nos mamíferos foram comuns as necroses dos túbulos contornados dos rins, acompanhadas de exsudação de células redondas, em maior número do que os polimorfonucleares, entre eles, os eosinófilos. Grande número de histiócitos fagocitando pigmento de hemosiderina e substância colóide, completavam os quadros histopatológicos reacionais. (Figura 10, 10.1 e 13, 13.1)

O segundo aspecto encontrado foi o dissociativo, que representa uma propriedade nociva dos clorofenoxiacetatos, encontrada nos peixes do rio Miranda e em Guaraqueçaba, fato que ocorre nas células dos parênquimas renal e hepático e, ao que parece, independe da hipersensibilidade específica mas está intimamente ligada aos efeitos produzidos, tanto pelo fitormônio natural, ácido indol-3-acético (IAA), como pelo 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D), efeitos que se iniciam e terminam por separar os hepatócitos ou, mesmo, destacar os elementos celulares do epitélio de revestimento dos túbulos contornados dos emunctórios renais, produzindo necroses isoladas ou generalizadas do parênquima renal.

A dissociação que se opera nas células epiteliais

parenquimatosas do revestimento epitelial dos túbulos contornados do rim se inicia a partir da membrana basal e segue em direção da luz tubular, permanecendo as células somente unidas pelos desmossomos e pelo aparelho conjuncional (Figura 17 e 17.1), propriedade nociva mas não tóxica deste grupo de fitormônios, quando absorvidos pelos vertebrados (MEDINA et al, 1988; GREMSKI et al, 1988).

O que na realidade importa, é conhecer de que forma e por qual dos mecanismos os fenoxiacetatos alcançam e poluem as águas, matam os peixes e agredem os que lidam com tais drogas.

BORDAS (1967), usando o sal sódico do 2,4-D para controlar as ervas daninhas na bacia hidrográfica do lago Balaton, na Hungria, verificou que traços de clorofenoxiacetatos e de outras substâncias químicas usadas na agricultura, poluíam as águas do lago Balaton e se acumulavam nas plantas e nos animais ali existentes, ao mesmo tempo, afetando o metabolismo e o desenvolvimento dos referidos bioindicadores, (ASHLEY, 1972; FRIEDMAN & SHIBKO, 1972 e TARZWELL, 1965). O referido herbicida, acumulado nos vários organismos, promoveu, também, intoxicação de muitas espécies de peixes durante o desenvolvimento (KAMLER, 1972; KAMLER et al, 1974; KORDE e ZVIRGZDS, 1971; MATLAK, 1972; MOUNT e STEPHAN, 1967).

Estudos semelhantes foram realizados por BANKOS & PONYI (1976).

Os estudos realizados por KAMLER et al (1974), atribuem muita importância aos solventes e aos agentes emulsificantes, isto porque, não somente o próprio agrotóxico mas, também os solventes e os emulsificantes podem ser sinérgicos

na ação e, com isso, produzirem efeitos muito mais graves. Entre as lesões funcionais que mais se destacaram foi o desacoplamento da oxidação fosforilativa das mitocôndrias hepáticas e renais em consequência da desorganização que o 2,4-D promove nas trabéculas mitocondriais (KAMLER et al, 1974; HIL TIBRAN, 1966; ZVIRGZDS et al, 1971). Foi demonstrado, ainda, por PFEIFER et al (1978) acompanhando esse processo, de abril a julho, o comportamento do 2,4-D no solo quando se observou que foram necessários de 1 a 2 meses, após as chuvas, para que o 2,4-D chegasse às águas do lago Balaton.

Essa observação deixa claro que a molécula do 2,4-D deva possuir propriedades de conjugação com as proteínas como qualquer droga e, se isto assim acontece, é de se supor que a referida droga deva se complexar com as proteínas do solo. Esta suposição encontra apoio nos trabalhos de LANDSTEINER & JACOBS (1936) os quais, tratando cobais com uma série de nitrobenzenos halogenados, verificaram que o efeito sensibilizante que se produzia no animal era maior quando um átomo ativado de hálógeno estava presente na molécula da droga.

Posteriormente, EISEN et al (1952), verificaram que o 2,4-dinitrobenzeno e derivados, substâncias lipossolúveis, se combinam com as proteínas da pele, possivelmente com a queratina ou com o procolágeno, os quais segundo MAYER (1957) seriam os precursores do antígeno sensibilizante definitivo.

Os estudos das lesões histopatológicas observadas por LANDSTEINER (1947), inculcam, em primeiro lugar, o dano capilar, (Figura 3.1 e 3.2) que resulta na lesão do vaso, com ruptura e formação de petéquias, purpuras e sufusões sanguí-

neas.

Tais manifestações se evidenciam tanto nas vísceras como na pele, (Figura 2 e 2.1). Os capilares dos tufos glomerulares se constituem numa lesão essencialmente de glomerulonefrite de hipersensibilidade às drogas, nos mesmos moldes como acontece com as sulfanilamidas. (DOMAGK).

Em associação à lesão capilar produzida pela reação às drogas, sobrevém intensa exsudação e infiltração de células redondas, presença de heterófilos e polimorfonucleares e, entre estes eosinófilos. Os glomérulos mostram diversos graus de comprometimento, desde lesões do tufo glomerular, até atrofia das alças glomerulares, como se observa nas aves, (Figura 13 e 13.1) desde a glomerulonefrite proliferativa até a atrofia das alças glomerulares, como se observa nos mamíferos.

LANDSTEINER & JACOBS (1936) estudaram uma série de nitrobenzenos halogenados e verificaram que os compostos sensibilizantes continham um átomo ativado de halógeno que em - prestava à molécula a capacidade para formar complexos sensibilizantes com a proteína, através de um amino grupo livre dos aminoácidos e, posteriormente, GELLS et al (1946), estudaram uma série de compostos que reagiam com a proteína combinando-se com os amino grupos, dando origem ao termo pró-antígeno que congrega todas as substâncias que se tornam antigênicas depois da combinação com a proteína, como certamente acontece com os clorofenoxiacetatos herbicidas e que, por certo, sensibilizaram os peixes e outros vertebrados, inclusive o homem (Figura 15 e 15.1), no caso um trabalhador rural responsável pela aplicação do TORDON (2,4-D + Picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina, transformando-se no primeiro caso humano de agressão pelo referido fitormônio sintético diag-

notificado no Paraná MEDINA et al (1988), cujas lesões cutâneas foram tratadas por terapêutica dessensibilizante (ARAÚJO NETO, 1988).

A maioria das drogas, quando introduzidas no organismo animal, dão formação a complexos protéicos com estabilidade variável. Assim comportam-se os metais pesados, em virtude da formação de um complexo de coordenação. Outras substâncias podem se absorver à proteína tão firmemente que sem que estejam combinadas mudam a estereoquímica da molécula.

Diferentes autores, estudando a natureza química das combinações das drogas sensibilizantes com a proteína, demonstraram que existe íntima relação entre os grupos químicos da molécula sensibilizadora com outros grupos químicos na proteína. É assim que EISEN et al (1952), verificaram que as substâncias portadoras de cloro, como é o caso do 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D), se combinam com a proteína da pele através dos amino grupos terminais das lisinas. EISEN & BELMAN (1953), verificaram que o 2,4-dinitrobenzeno sulfonil cloreto e o 2,4-dinitrotiocianato reagem in vivo com a cistina e a cisteína das proteínas da pele; HOWARD & WILD (1957), verificam que as reações dos compostos diazo com as proteínas somente se realizam quando esta possui aminoácidos com amino grupos terminais.

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) possui condições moleculares que facilitam a conjugação do ácido com a proteína do sangue ou dos tecidos: 1.- Os fitormônios do grupo do ácido indol-3-acético são substâncias lipossolúveis e, do mesmo modo, a mistura 2,4-D mais Picloram, também é absorvida pela pele e pelas mucosas; 2.- A molécula do 2,4-D apre

senta dois pólos eletronicamente ativos, o oxigênio hidroxílico da carboxila e o carbono 6 do núcleo benzênico; 3.- A halogenação dos carbonos 2,4 e 5 pelo cloro aumenta o valor da carga positiva, no carbono 6 do anel benzênico, fatos que justificam, sobejamente, as propriedades que as heteroauxinas cloradas apresentam para se conjugarem às proteínas. Por outro lado, TERESI & LUCK (1948) observaram que a transformação do fenilacetato em fenoxiacetato aumenta, neste último, a capacidade para formar conjugados com as proteínas, transformando-a em proteína anômala.

ZIMMERMAN & HITCHCOCK (1948), confirmaram que a halogenação dos fitormônios aumenta-lhes as propriedades para se conjugarem às proteínas. A formação do conjugado 2,4-D com a proteína pode ser considerada em razão da verificação de SILVA e MEDINA (comunicação pessoal), quando observaram que a proteína contrátil do músculo do coelho isolada na forma G (globular), diminui de viscosidade quando tratada com doses crescentes da mistura herbicida (2,4-D + Picloram), voltando a se elevar logo que os prováveis pontos de conjugação na proteína foram saturados pelos grupos ou funções químicas complementares ou existentes na molécula da droga. (Figura 18 e 18.1) ROBERTSON & KIRKWOOD (1970), analisando nos vegetais a reatividade e os efeitos produzidos pelo 2,4-D, no metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos, concluem que o mecanismo de ação do 2,4-D se inicia pela conjugação com o aspartato, cujos efeitos se exteriorizam pela liberação da atividade da RNA polimerase, dando lugar à síntese do RNA e das proteínas, seguida de intensa proliferação celular (Figura 19, 19.1, 19.2 e 19.3).

A desorganização das criptas mitoncondriais é uma propriedade de todas as auxinas, especialmente dos clorofenoxia cetatos (Figura 17.1) e inclusive da própria auxina natural, o ácido indol-3-acético, motivo pelo qual todas as suas propriedades são sinérgicas. As misturas 2-4-dicloro e 2,4,5-tri - clorofenoxiacetatos, o Agente Laranja inicialmente comercializado pela BASF sob o título comercial de U-46, foi empregada de início no Mato Grosso do Sul e depois, substituída pela mistura (2,4-D + Picloram) da DOW QUÍMICA. Em virtude da grande toxicidade apresentada pela primeira combinação, constituem-se em mistura sinérgica de fitormônios sintéticos e de alta atividade desnaturante das mitocôndrias e desacopladoras da fosforilação oxidativa. Normalmente, é nas criptas' mitoncondriais onde se operam as principais etapas do metabolismo energético, especialmente numa das mais importante regiões do organismo. as células do revestimento epitelial dos túbulos contornados dos emunctórios renais. Em experimentos' levados a efeito neste laboratório (BACILA, informação pessoal) foi verificado que o TORDON altera as propriedades físico-químicas da mitocôndria isolada de rim de aves (Gallus gallus L) e de peixes (Cyprinus carpio).

A conjugação dos fitormônios com a proteína poderá oferecer perspectivas que justifiquem a sua maior resistência à degradação oferecida pelas forças ambientais.

Nesta situação, e na qualidade de conjugado proteico, os clorofenoxiacetatos poderiam alcançar, por propagação, o leito dos rios ou das lagoas e por absorção, os tecidos do organismo, sensibilizando-o.

Com respeito à primeira hipótese, não é a mesma, de

todo inviável, uma vez que a Hungria, país piscicultor, por excelência, teve o mesmo problema com o 2,4-D que poluiu o lago Balaton, Traços do referido herbicida, juntamente com outras substâncias biocidas em baixas concentrações, se acumularam nas plantas e nos animais, afetando-lhes desfavoravelmente o metabolismo e o desenvolvimento (ASHLEY, 1972; FRIEDMAN & SHIBKO 1972; TARZWELL, 1965).

V. SUMÁRIO

O autor participando dos monitoramentos levados a efeito em dois impactos ambientais ocorridos no rio Miranda, MS, em 1985/6 e em Guaraqueçaba, PR, em 1988, observou entre os peixes, lesões orgânicas e cutâneas, que correspondiam a reações de hipersensibilidade específica mediada por células que correspondia aos sinais e sintomas descritos por LANDS - TEINER (1947).

Os estudos experimentais levados a efeito em peixes e mamíferos permitiram observar a ocorrência das mesmas lesões cutâneas e orgânicas nas duas espécies de bioindicadores quando tratados cronicamente, via oral, pela solução herbicida (2,4-D + Picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina e adquirida no comércio de defensivos agrícolas.

A reprodução experimental e a comparação das lesões macro e microscópica que se produziram nos peixes em ambos os impactos ambientais falam em favor da especificidade dos efeitos de sensibilização específica produzidos pela mistura herbicida muito embora não se deva deixar de lado prováveis efeitos produzidos pelos solventes e emulsificantes empregados no preparo do herbicida.

Em pesquisas realizadas nos arredores de Guaraqueçaba tomou-se conhecimento de um caso de hipersensibilidade específica cutânea ocorrida em humano, justamente no trabalhador rural encarregado da aplicação do agrotóxico, que o fez em fevereiro e em setembro do mesmo ano ocasionando a eclosão da sintomatologia estudada.

A hipersensibilização foi confirmada pela terapêuti-

ca dessensibilizante.

ABSTRACT

While monitoring two environmental impacts (Rio Miranda, MS, 1985/6 and Baia de Guaraqueçaba, PR, 1988) the author was able to observe organic lesions among the fish collected in both environments which were caused by specific hypersensitivity cell mediated reaction corresponding to signals and symptoms described by LANDESTEINER (1947). The experimental studies carried out in fish and mammals allowed to observe the occurrence of the same organic and cutaneous lesions in both groups of bioindicators when subjected to a long treatment by oral way, with a commercial solution of the herbicide 2,4-D plus Picloram, 64/240 triisopropanolamine ester, employed as defensive for agriculture purposes.

The experimental reproduction as well as the comparison of the lesions in both macro and microscopic levels which appeared in fish subjected to the above mentioned environmental impacts, this speak in favor of the specificity of the effects produced by that herbicide, in spite of the fact that it cannot be discarded possible effects produced by solvents and emulsifying agents employed in the preparation of the commercial herbicides.

In researches carried out in the surroundings of Guaraqueçaba we were aware of the occurrence of a case of a specific cutaneous hypersensitivity in a human being, precisely in a worker in charge of the application of the herbicide. This work was got done in February and then in September of the same year, stimulating the eclosion of the symptoms of hypersensitivity, furthermore, this was confirmed by a desen

sitizing therapeutic.

VI. CONCLUSÕES

1. Os clorofenoxiacetatos são herbicidas químicos sintéticos atóxicos, porém altamente nocivos e iatrogênicos.
2. Os clorofenoxiacetatos estiveram implicados nos impactos ambientais ocorridos no rio Miranda (MS) em 1985/6 e em Guaraqueçaba, Antonina e Morretes em 1988.
3. O diagnóstico causal dos respectivos diagnósticos se fundamentou nos aspectos e na etiopatogenia das lesões apresentadas pelos órgãos e pelos tecidos dos animais vitimados pelo acidente ecológico e ainda pela experimentação.
4. Foram observados durante os exames dois aspectos característicos. O primeiro acompanhou de perto as modificações fisiopatológicas das reações de hipersensibilidade específica mediada por células e das descritas por LANDSTEINER (1947). O segundo, dissociação celular dos parênquimas em consequência do provável efeito do herbicida sobre as proteoglicanas. Os clorofenoxiacetatos agredem preferencialmente os emunctórios hepático e principalmente o renal, produzindo nos animais importante albuminúria a partir do 5º dia da administração. MANGILI et al (1988).
5. Os referidos fitormônios lesam as mitocôndrias desagregando as criptas mitocondriais, modificam o metabolismo dos ácidos nucleicos, a síntese de proteínas e lesam a integridade das membranas.
6. Provavelmente os referidos fitormônios sintéticos estimulam a RNA-polimerase, a produção de RNA-ribossômico e a mul-

tiplicação celular.

7. Lesões de hipersensibilidade específica descritas por LANDSTEINER foram comprovadas na pessoa de um lavrador (A.A.S.) aplicador do herbicida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, R. T., Weinheimer, P. F., Hildemann, W.H & Evans, E.E. (1971a). Bactericidal antibody response in the Pacific hag fish, *Eptatretus stoutii*. *Infection Immunity* 4, 160-166.
- ASHLEY, L. M., (1972). Nutritional Pathology, in *Fish Nutrition* (J.E. Halver, ed.) pp. 439-537 New York, London, Academic Press.
- BANKŐS, L. and J. PONYI, (1976) citado por PETER BIRŐ (1979) - Acute effects of sodium salt of 2,4-D on the early developmental stages of bleak *Alburnus alburnus*. *Academia Hungara de Ciências. Instituto de Pesquisas Biológicas, Tihany 8237, Hungria. J. Fish Biol.* 14:101-109.
- BOGLIOLO, L., (1979) *Patologia Geral Básica*, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro - RJ, 713 pp
- EINSEN, H. N., L. ORRIS and S. BELMAN (1952) Elicitation of delayed Allergic skin reaction with haptens: The dependence of elicitation on haptens combination with protein. *J.exp. Med.* 95, 473.
- FRIEDMAN, L. and S. I. SHIBKO, (1972) Nonnutrient Components of the Diet. In *Fish Nutrition* pp. 182-254 (J. E. Halver, ed) New York; London Acad. Press.
- GELL, P. G. H., C. R. HARRINGTON and R. PITT-RIVERS, (1946), The antigenic function of simple chemical compounds: production of precipitins in rabbits. *Brit. J. exp. Path.*, 27 -267

- GOOD, R. A. & PAPERMASTER, B. W., (1964) Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. *Adv. Immun.* 4, 1-115.
- GREMSKI, W. et al, (1988) Aspecto ultra-estrutural da glândula submandibular de rato adulto tratado com fitormônios clorados. Trabalho apresentado no VI Congresso Brasileiro de Biologia Celular. Apresentação nº 20 - Brasília 29/07/88.
- HOWARD, A. N. and F. WILD, (1957) The reaction of diazonium compounds with amino acids and proteins. *Biochemical J.* 65 - 651-660.
- HILTIBRAN, R. C., (1966) The effect of 2,4-D on bluegill liver mitochondrial enzyme systems. Trabalho apresentado a Weed Soc. of America, St. Louis.
- HILDEMANN, W. H. & THOENES, G. H., (1969) Immunological responses of Pacific hagfish. I: Skin transplantation immunity. *Transplantation* 7, 506-521.
- KLONTZ, G. W. & ANDERSON, D. P., (1970) Oral immunization of salmonids: a review. *Special Publ. Nº 5. Am. Fish Soc.* 16-20
- KORDE, B. A. and J. K. ZVIRGZDS, (1971) The effect of 2,4-D Na on the survival of fertilized eggs and the rate of early embryonic development of loach (*Misgurnus fossilis*, L.) in *Eksperimental naja Vodnaja Tokikologija* Ch. 2 pp. 31 - 42' Riga: Zinatne.
- KAMLER, E., (1972) Bioenergetical aspects of influence of 2, 4-D-Na on the early development stages in carp (*Cyprinus carpio* L.) *Pol Arch. Hydrobiol.* 19: 451-474.
- LANDSTEINER, K. and J. JACOBS, (1936) Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. III. Anaphylaxis induced by arsphename *J. exp. Med.* 64: 717-721.

- LANDSTEINER, K., (1947) The specificity of serological reaction. Cambridge Mass. Harvard University Press.
- LINTHICUM, D.S. & HILDEMAN, W.H., (1970) Immunological responses of Pacific hagfish. III. Serum antibodies to cellular antigens. J. Immun. 105, 912-918.
- MESNIL, A., (1895) Sur la mode de resistance des vertebres inférieures aux invasions microbiennes. Annls. Inst. Pasteur, Paris 2, 301-311.
- METCHNIKOFF, E., (1892) Leçons sur la Pathologie Comparée de l'Inflammation. Paris: Masson.
- METCHNIKOFF, E., (1901) L'Immunité dans les Maladies Infectieuses. Paris: Masson.
- METCHNIKOFF, E., (1905) Immunity in Infective Diseases. Cambridge: Cambridge University Press.
- MAYER, R.L., (1957) The role of carrier in the formation of complete antigens. J. Allergy 28, 191-201.
- MOUNT, D.I. and C.E. STEPHAN, (1967) A method for establishing acceptable toxicant limits for fish-malathion and butoxyethanol ester of 2,4-D. Trans. Am. Fish. Soc. 96, 185-193.
- MATLAK, O., (1972) Sodium salt (2,4-D) related to embryo and larval development of carp. Pol. Arch. Hydrobiol. 19, 437-450.
- MANGILI, O.C.; TARARTHUCH, A.L.; CIPRIANO, I.M.; MEDINA, H. S.; GREMSKI, W. (1989) Perfil preliminar dos efeitos nefrotóxicos do herbicida "tordon". IV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. Trabalho apresentado em Caxambu (MG), em 28 de junho a 02 de julho de 1989.

- NOGUCHI, H. (1903) A study of immunization - Haemolysins, ' agglutinins, precipitins, and coagulins in cold-blooded a nimals. Zentbl. Bakt. Parasit Kde. Abt. I, Orig. 33, 353-362.
- PETERS, R.A., (1952) Lethal synthesis. Proc. Roy. Soc. B. ' 139, 143.
- PAPERMASTER, B.W., CONDIE, R.M. & GOOD, R.A., (1962) Immune response in the California hagfish. Nature, Lond. 196, 355-357.
- PAPERMASTER, B.W., CONDIE, R.M., FINSTAD, J. & GOOD, R.A. ' (1964) Evolution of the immune response. I. The phylogenet ic development of adaptive immunologic responsiveness in vertebrates. J. Exp. Med. 119, 105-130.
- PFEIFER, Gy., J.E. PONYI and Z. NAGY, (1978) Pesticides Re- sidues in Lake Balaton. In Symposium on Human Impacts on Life in Fresh Waters (J. Salanki and Birő, ed.) Symp. Biol. Hung. vol. 19.
- ROBERTSON, M.M. and R.C. KIRKWOOD, (1970) The Mode of acti- on of foliage applied translocated herbicides with partit ular reference to the phenoxi-acids compounds. II. The ' mechanism of factors influencing translocation, metabolism and biochemical inhibition. Weed Res. 10, 94-115.
- SNIESZKO, S.F., (1970) Immunization of fishes: a review. J. Wildl. Dis. 6, 24-30.
- SMITH, R.T., MIESCHER, P.A. & GOOD, R.A., (1966) Phylogeny' of Immunity. Gainesville: University of Florida Press.
- TERESI, J.D. and J.M. LUCK, (1948) The combination of orga- nic anions with serum albumin. VI. Quantitative studies by' equilibrium dialysis J. Biolog. Chem., 174, 653.

- TARZWELL, C.M., (1965) The toxicity of Synthetic Pesticides to Aquatic Organism and Suggestion for Meeting the Problem. Ecology and the Industrial Society, pp.197-218. Oxford: Blackwell.
- ZIMMERMAN, and HITCHCOCK (1942) - in CREMLYN - (1979) - Pesticides, Preparation and Mode of Action, pp. 142 John Wiley & Sons. Cjichester - New York - Brisbane - Toronto.
- ZVIRGZDS, J.K., Z.M.LACE, M.V. GRUNDULE and A.A. ZUJKA, (1971) Effect of 2,4-D-Na in oxidative phosphorylation, mechano-chemical changes and adenos in-triphosphatase activity of mitochondria of carp liver, in Eksperimental'naja Vodnaja Tokikologia, Ch 2, pp. 12-25, Riga: Zinatne.

VIII. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

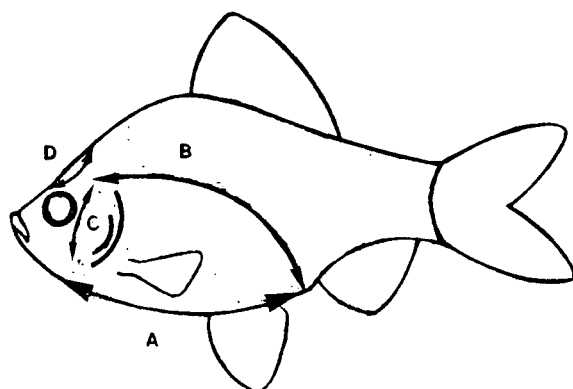


Figura 1 - Cortes anatômicos para estudo e necrópsia de peixes.

A. Corte longitudinal	B. Corte lateral
C. Corte opercular	D. Corte cranial



Figuras 2 e 2.1 - Eritema petequial situado sob as escamas de um corimbata capturado no rio Miranda (MS).
Eritema superficial de bagres capturados na baía de Guaraqueçaba (PR). Observar a cor avermelhada da pele e da região perioral.



Figuras 2.2 e 2.3 - Órgãos celômicos do corimbatã.
Os emunctórios hepato-renais foram, entre os peixes,
os que mais sofreram. Foi comum a coloração amarelo-
avermelhada do fígado e a coloração castanho-avermel-
lhada dos mesonefros.

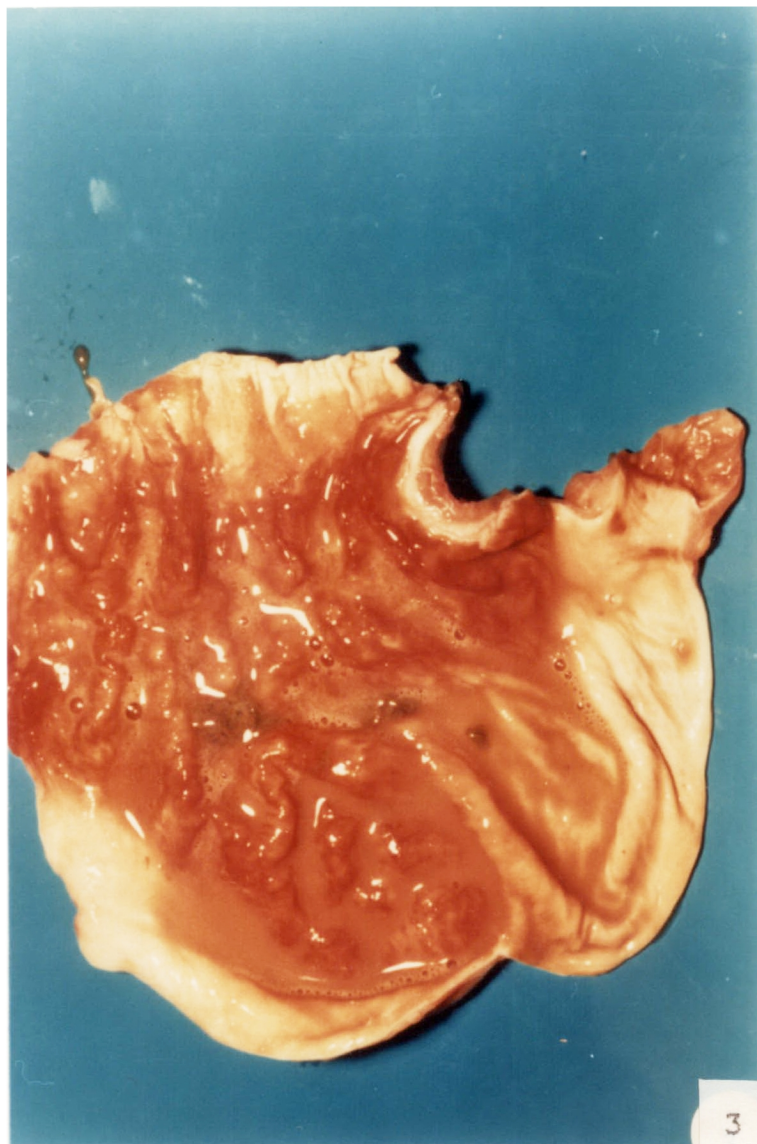
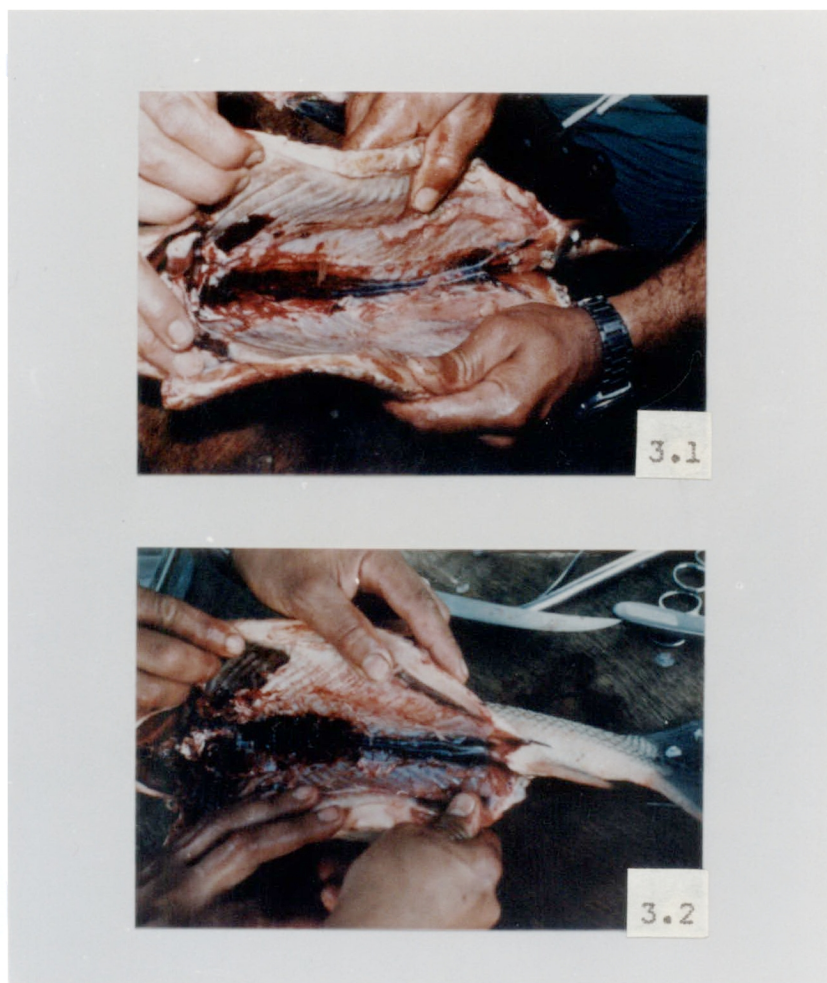
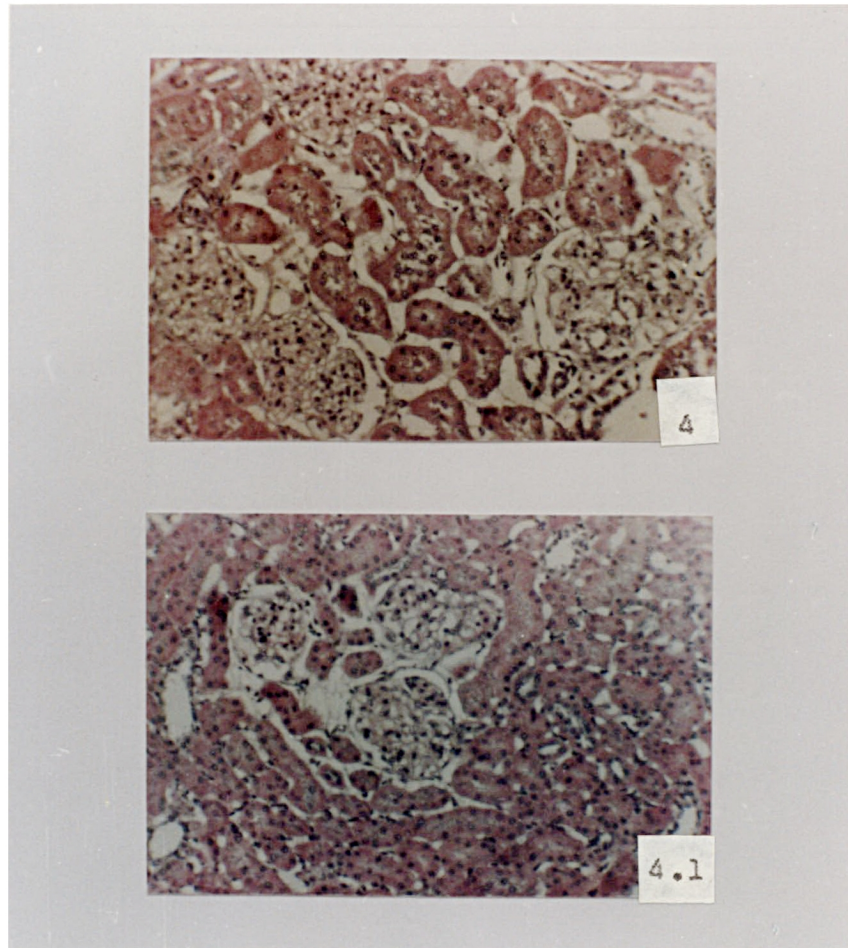


Figura 3 - Estômago de bagre capturado no rio Miranda (MS) apresentando a mucosa estomacal avermelhada semelhante às encontradas nos processos cáustico-inflamatórios.



Figuras 3.1 e 3.2 - Corimbatãs capturados no rio Miranda (MS).
Quando eviscerados especialmente, os corimbatãs,
apresentaram sufusões sanguíneas que circundavam
os mesonefros.



Figuras 4 e 4.1 - Lesões glomerulares e dos túbulos contornados do rim, produzidas pela auxina natural, o ácido indol-3-acético (IAA) e pela heteroauxina (NAA). Em ambos os casos predominam o esvaziamento citoplasmático, vacuolização do glomérulo, desprendimento da membrana basal, necrose dos túbulos contornados e dilatação da cápsula de Bowman. Todos os ratos da experiência apresentaram albuminúrias após o 5º dia.

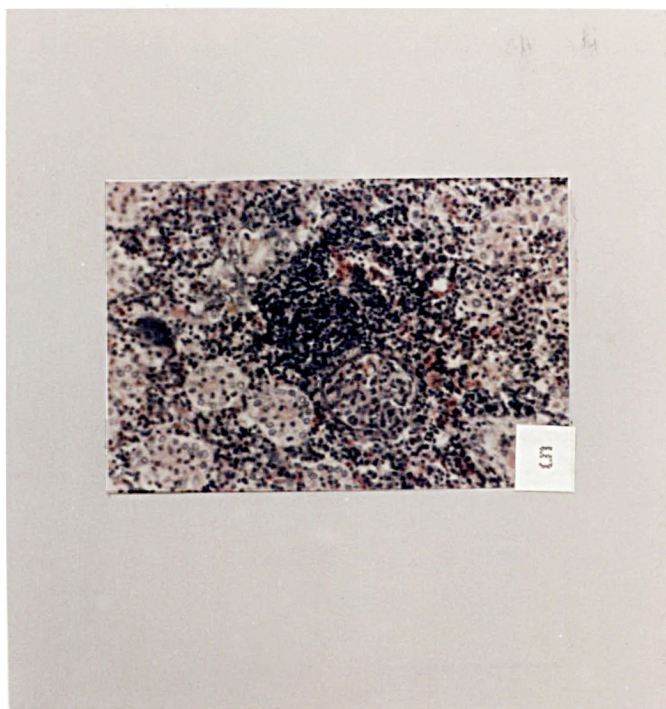
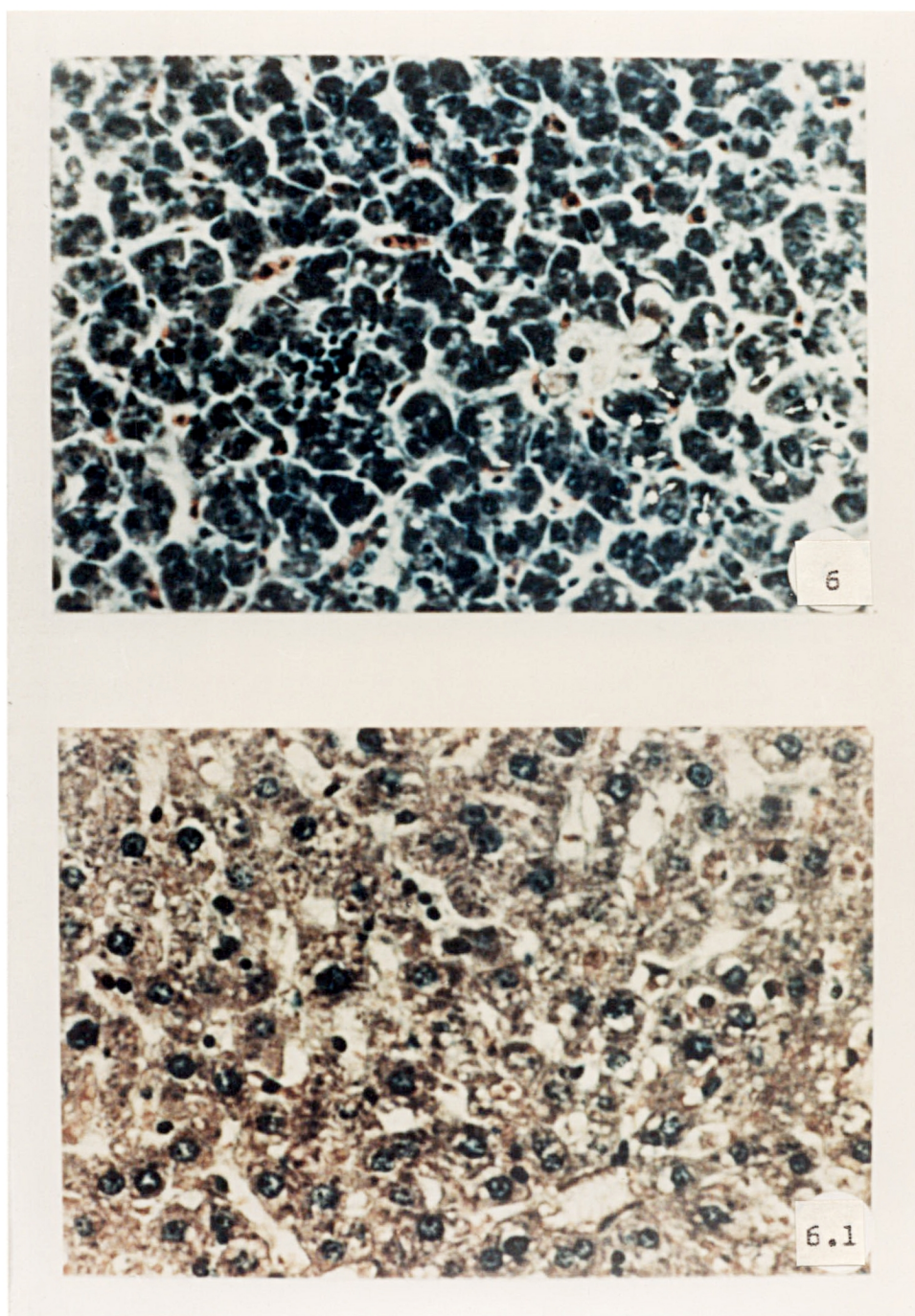


Figura 5 - O quadro histopatológico observado na Figura 5 corresponde aos dados fornecidos por LANDSTEINER (1947) e descreve um exsudato linfoplasmocitário difuso intersticial envolvendo uma glomerulonefrite e vários graus de dano capilar com proliferação glomerular dos tufo glomerulares, necrose tubular. O lado direito superior da figura onde se observam células epiteliais dissociadas representa um efeito colateral da ação farmacológica do fitormônio em estudo. Envolvimento difuso dos rins exibindo todas as características da glomerulonefrite proliferativa.



Figuras 6 e 6.1 - Fígado de rato. Trabalho experimental.

Normalmente o fígado é um órgão parenquimatoso compacto e carnoso. A ingestão diária de água contendo 1,1mg de 2,4-D + Picloram/litro, tornou o órgão amolecido e suas células antes reunidas formando traves direcionadas para a veia centro lobular sofrem processo de necrose e separação dos hepatócitos, alguns completamente isolados dos demais. Observar entre os asteriscos (*) da figura 6 hepatócitos isolados, porém, vivos. Na figura 6.1, necrose hepática produzida por fitormônio natural (IAA).

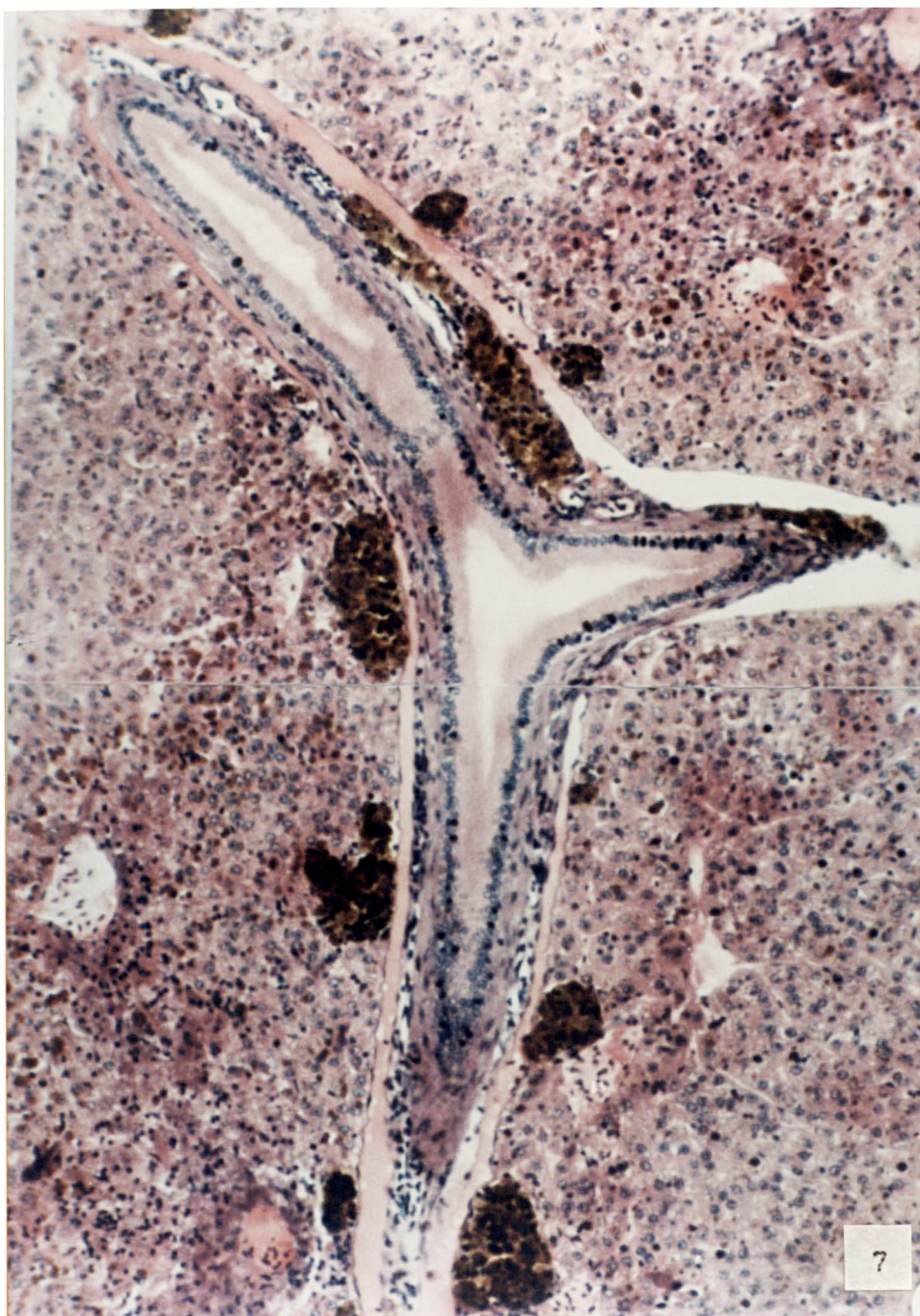


Figura 7 - Fígado de corimbatã (MS). O epitélio hepático perdeu todo aspecto trabecular normal, apresenta hepatócitos binucleados, hepatócitos isolados, pigmentação castanha difundida pelo parênquima do órgão e acúmulos de substância em aglomerados de histiócitos' situados em volta de um canal biliar altamente hipertrofiado.

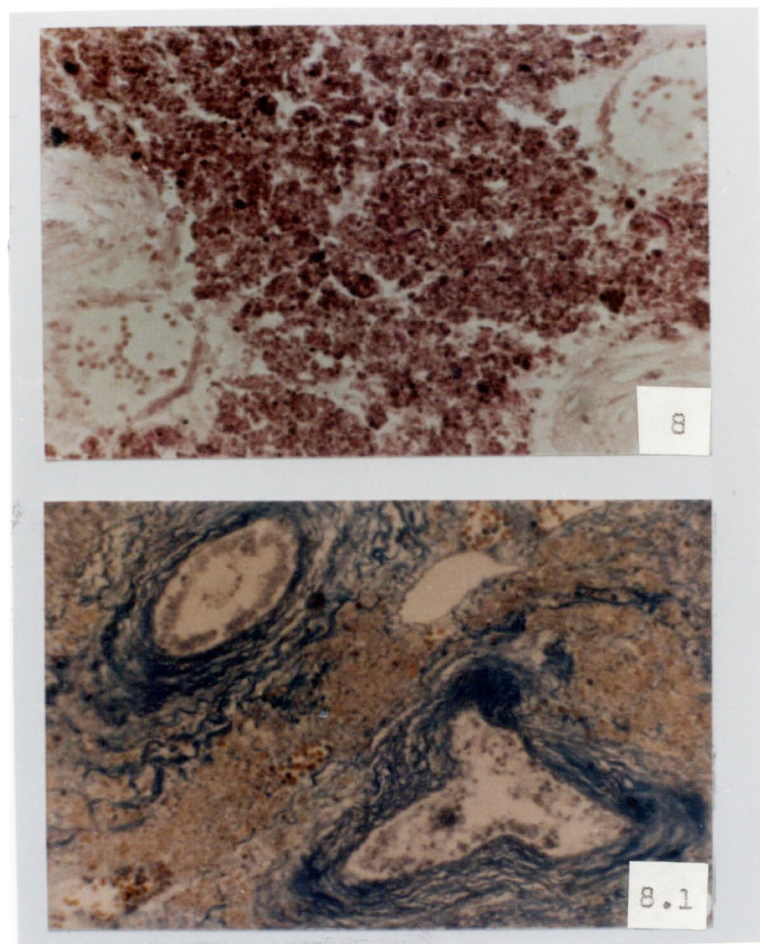


Figura 8 e 8.1 - Fígado de corimbatã (MS). Espaço Porta esclerosado contendo substância ceróide corada pela fucsina de Ziehl^T e fibrose dos vasos e dos canalículos biliares corados em azul pelo método de Mallory.

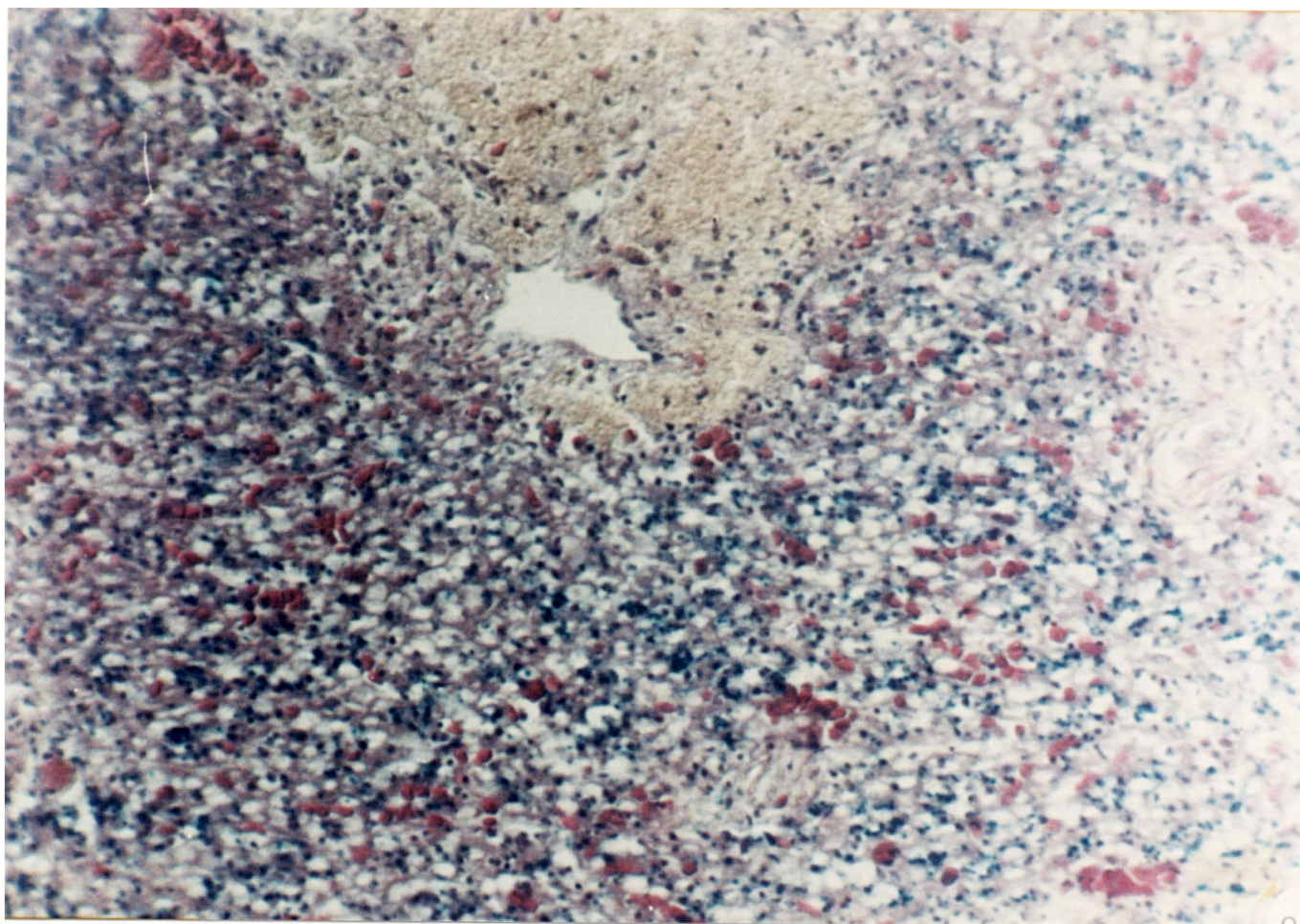


Figura 8.2 - Processo crônico contendo histiócitos fagocitando pigmentos de hemosiderina, substância hialina, vasos com paredes fibrosadas, degeneração gorda e pigmento céreo em volta de uma veia centro lobular.

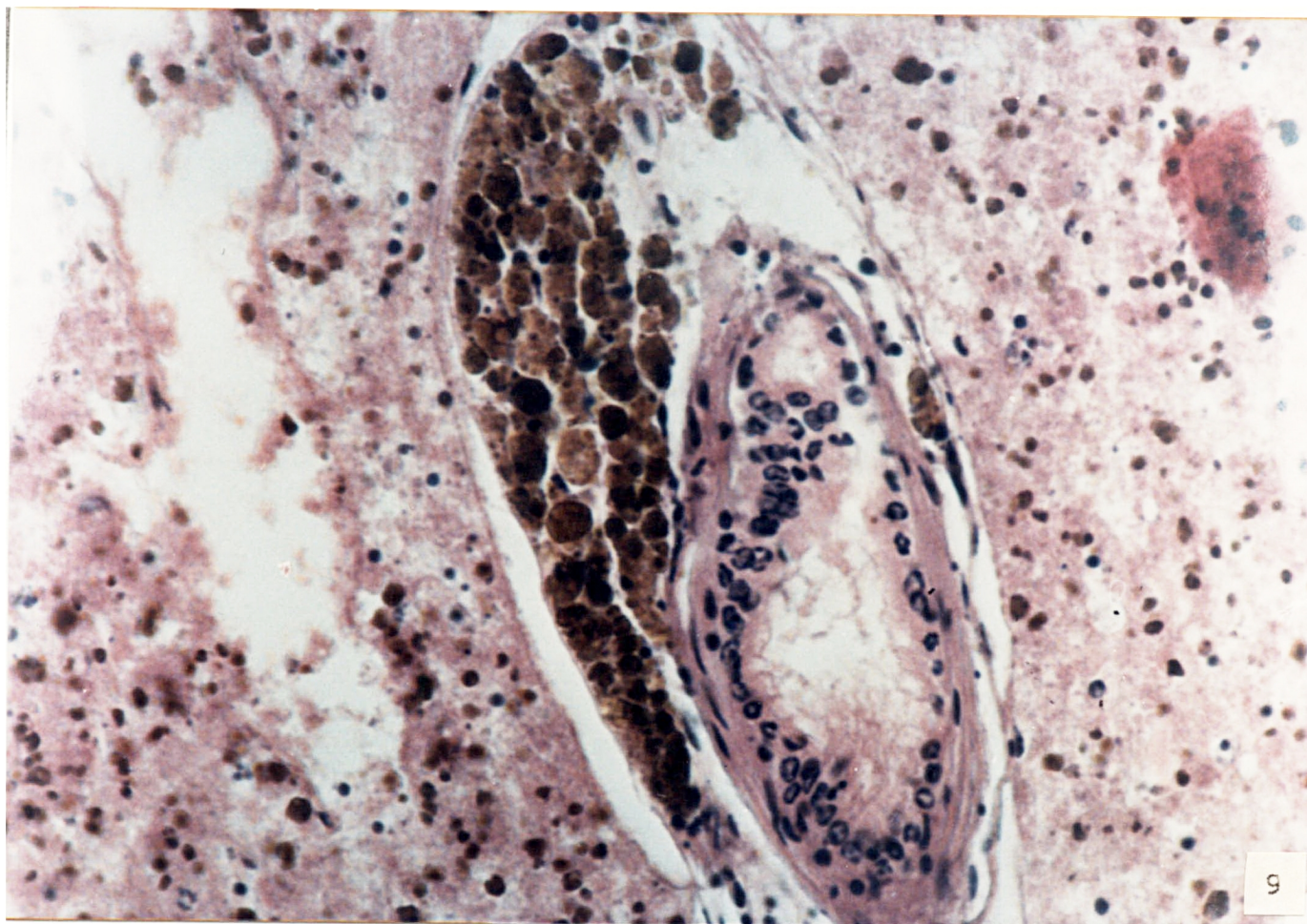
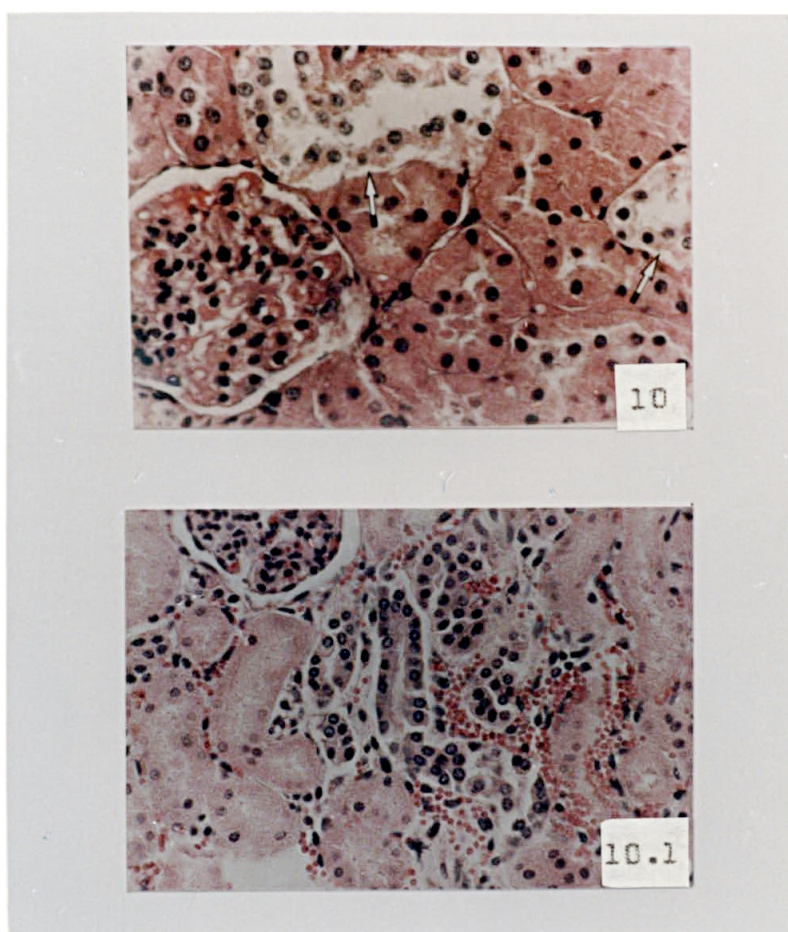


Figura 9 - Necrose, fibroses da adventícia de um vaso com hiperplasia endotelial, transformação gordurosa, picnose dos hepatócitos, infiltração dos tecidos fibrosados, pigmento castanho nos hepatócitos e nos espaços de Disse dilatado com histiócitos contendo pigmento castanho que completam o quadro histopatológico.



Figuras 10 e 10.1 - Rim de carneiro tratado com heteroauxinas (2,4-D + Picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina 1mg/ ' 1.000ml de água destilada durante 30`dias, via o - ral.

Observar a dissociação e desprendimento das células epiteliais dos túbulos contornados dos emunctórios renais, necroses tubulares e núcleos picnóticos. Hi perplasia das células endoteliais e aumento da celu laridade do glomérulo.

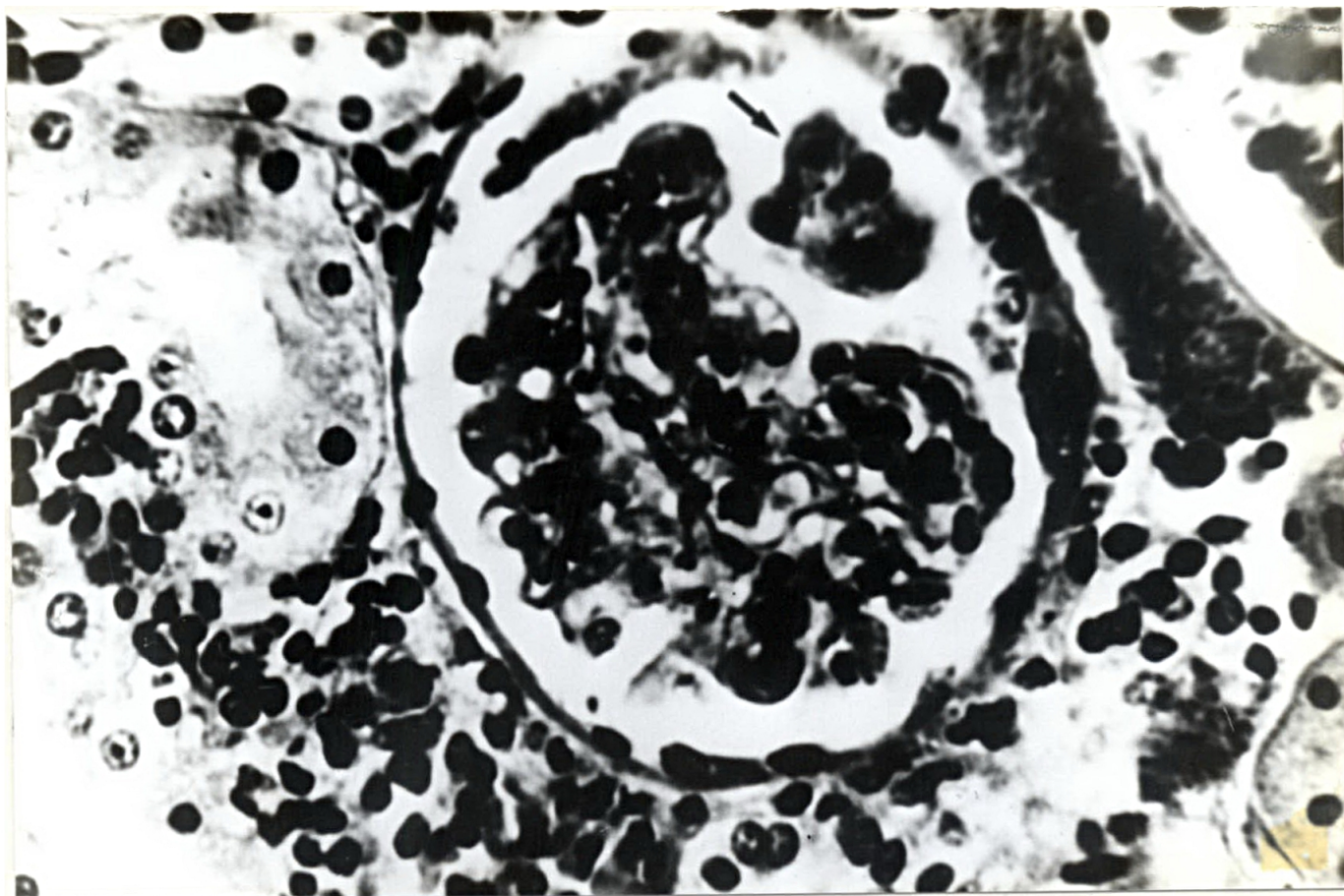
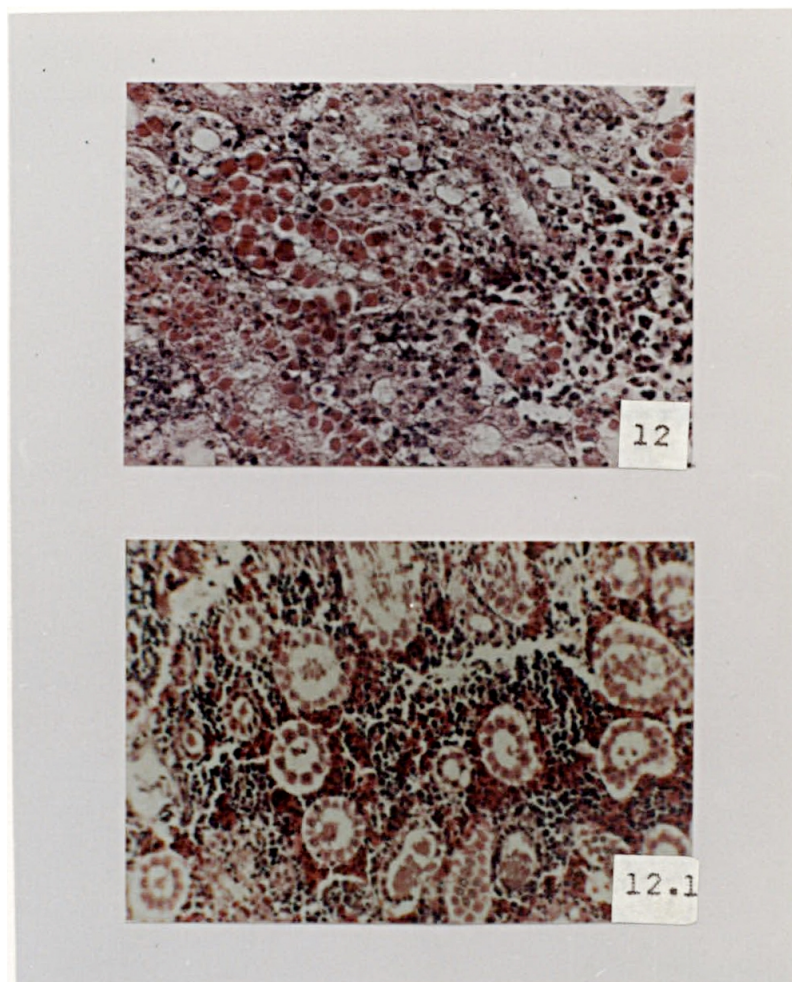
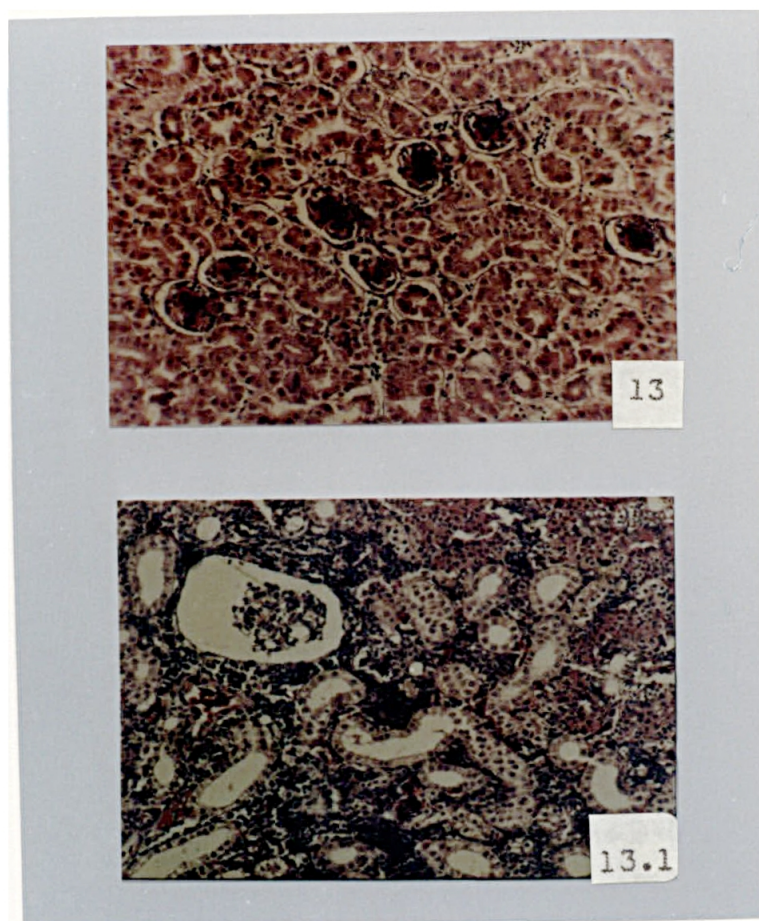


Figura 11 - Rim de rato tratado com a solução herbicida 2,4-D + Picloram 1,0 mg/1.000 ml em água potável durante 60 dias. Observar necrose tubular, núcleos picnóticos, infiltração linfoplasmocitária eversão do epitélio desprendido para dentro do glomérulo.



Figuras 12 e 12.1 - Mesonefro de corimbata apresentando degeneração hialina, processo crônico infiltrativo, infiltrado linfoplasmocitário, hemorragia intersticial, descolamento e dissociação das células tubulares do rim. A figura 12.1 mostra descolamento do epitélio renal, dissociação das células epiteliais que se acumulam na luz tubular.



Figuras 13 e 13.1 - A figura 13 mostra rim de ave tratada com heteroauxinas (2,4-D + Picloram) 64/240, éster Triisopropanolamina 1 mg/1.000 ml de água destilada, durante 30 dias, via oral. Observar a atrofia dos glomérulos, o descolamento do epitélio tubular, picnose e necrose do epitélio dos túbulos renais. A figura 13.1 é rim de baixe capturado em Guaraqueçaba e mostra a atrofia glomerular, descolamento do epitélio tubular e a dissociação de suas células.

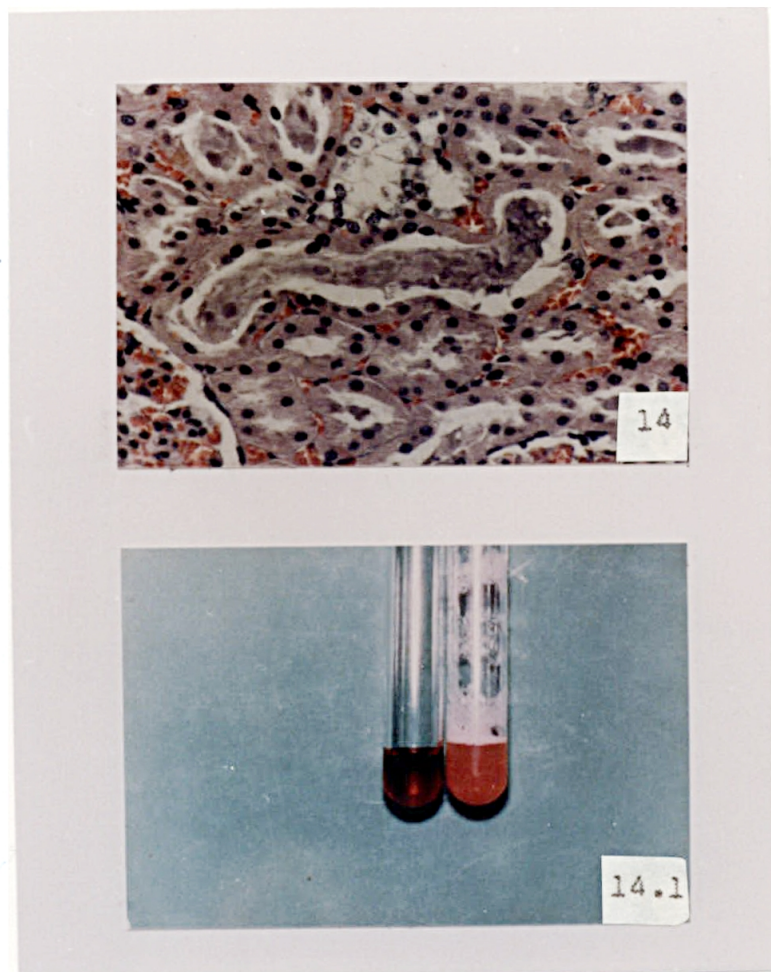
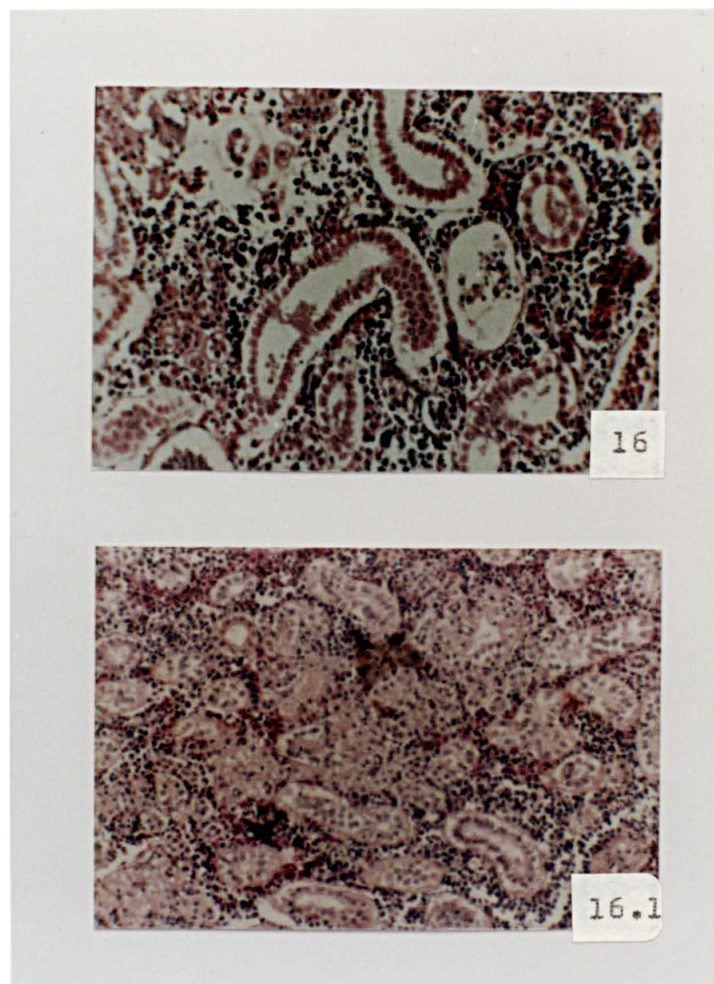


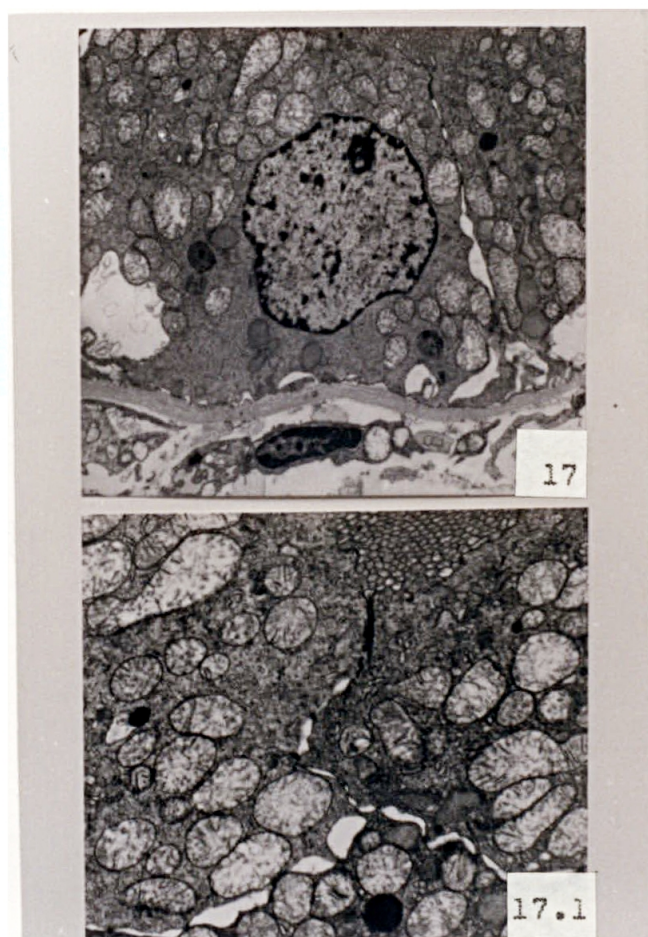
Figura 14 e 14.1 - Rim de rato tratado com a solução herbicida 2,4-D + Picloram 1mg/1.000ml de água destilada ingerida durante 60 dias, via oral. A figura mostra túbulo renal contendo um cilindro epitelial originado do descolamento do epitélio renal, formando um trombo. A figura 14.1 mostra a presença de albumina na urina de 24 horas, diluída.



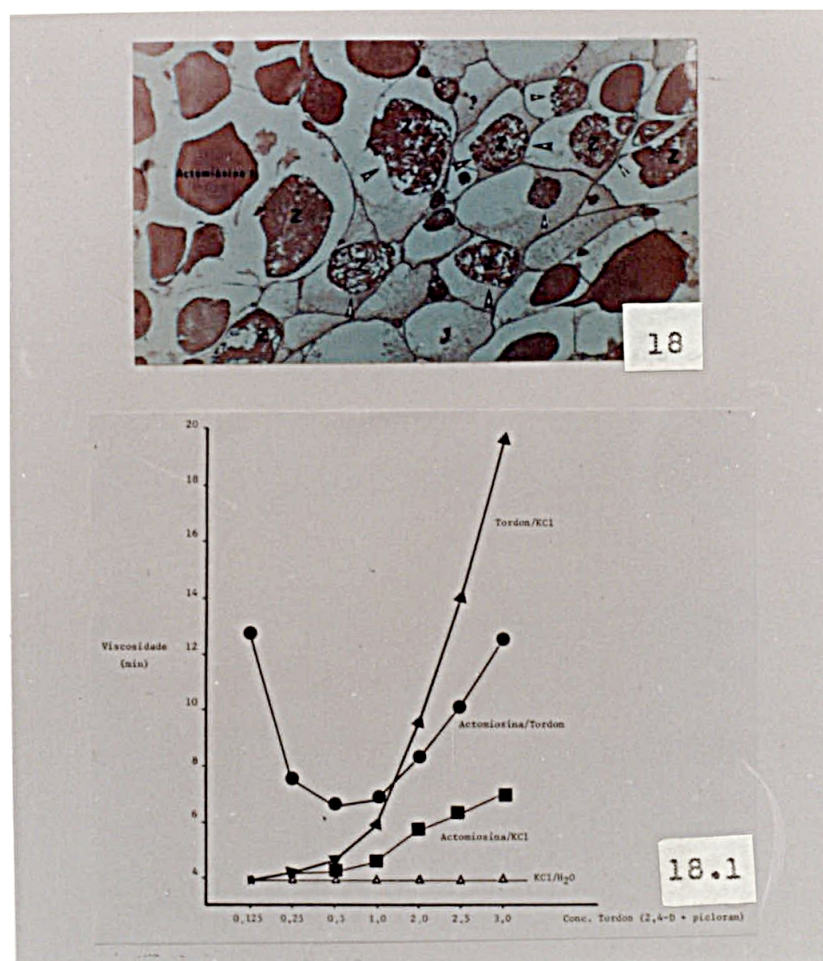
Figuras 15 e 15.1 - Retratar acidente de hipersensibilidade específica cutânea cujas características anamnésicas e semiológicas de acidente produzido por agente químico sensibilizante. O diagnóstico etiológico das afecções foi confirmado pe la terapêutica específica dessensibilizante.



Figuras 16 e 16.1 - Como na figura 5, corimbatã (MS), o baço capturado em Guaraqueçaba, apresenta igualmente glomerulonefrite intersticial tipo LANDSTEINER (1947). Observar o infiltrado linfoplasmocitário, presença de histiócitos e desfolhamento epitelial.



Figuras 17 e 17.1 - Rim de rato tratado via oral com a solução herbicida (2,4-D + Picloram) contendo 1.1 mg/litro. Todos os animais deste grupo beberam espontaneamente água potável com o herbicida em experimentação durante 30 dias. Observar as lesões moleculares produzidas no parênquima renal e estudadas em microscopia eletrônica com um aumento de 8.930 vezes. A membrana basal se apresentou estratificada de modo idêntico ao que ocorre no diabetes melitus. As mitocôndrias estavam lesadas apresentando cristas mitocondriais partidas e desordenadamente distribuídas. Um espaço intercelular^T separa células epiteliais, que se mantêm presas somente pelos desmossomos e pelo aparelho conjuncional. A capacidade energética do tecido renal está prejudicada face o desacoplamento da oxidação fosforilativa.



Figuras 18 e 18.1 - A formação do conjugado 2,4-D + proteína pode ser considerada quando SILVA e MEDINA (trabalho em preparação) observaram que a proteína contrátil do músculo do coelho, isolada na forma G (globular), diminui de viscosidade quando tratada com doses crescentes da mistura herbicida (2,4-D + Picloram), voltando a crescer logo que os prováveis pontos de conjugação na proteína foram saturados pelos grupos ou funções químicas complementares, existentes na molécula da droga. A figura 1, preparação histológica do músculo jejuno, mostra a proteína contrátil das fibrilas musculares atingidas pela degeneração de Zenker, o que fez com que se levantassem suspeitas dos músculos dos mamíferos estarem também atingidos pelas mesmas lesões degenerativas. Que na realidade se confirmou, ao serem examinadas preparações musculares de carneiro intoxicado. As experiências "in vitro" utilizando actomiosina de coelho confirmaram também a hipótese levantada, cujo resultado está expresso no gráfico da figura 2.